



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE ORIGEM ENDÓGENA E EXÓGENA
DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EM MATRIZES
QUERATINIZADAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA**

JOANA LETÍCIA SARDÁ MATTOS

Florianópolis
Novembro/2018

Joana Letícia Sardá Mattos

**DETERMINAÇÃO DE ORIGEM ENDÓGENA E EXÓGENA
DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EM MATRIZES
QUERATINIZADAS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA**

Relatório apresentado ao
Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial
da disciplina de Estágio II (QMC
5512)

Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis
Novembro/2018

Dedico esse trabalho ao meu avô Lindomar Sardá, “In memoriam”, por ser minha força nos momentos de angústia e tristeza e meu sorriso nas horas de alegria

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu guia em todas as horas e momentos de minha vida.

Agradeço aos meus pais Patricia e Jaceguay, por toda a ajuda, por todos os conselhos, pelo apoio, e amor. Mãe obrigada por ser meu alicerce e não me deixar desistir e sempre me apoiar em meus sonhos.

À minha avó Nesci e minha Dinda Beatriz por toda a ajuda de vida, pela criação, por acreditarem em mim. Ao Gabriel e a Ana Luiza, por serem sempre minha luz e alegria.

Aos meus amigos de infância Bárbara, Eduardo e Daniel, por sempre me apoiarem e estarem comigo na realização do meu sonho. As minhas amigas que a química me trouxe Juliana e Francieli, obrigada por todas as forças que vocês me deram durante esses anos.

À minha tia que a vida me deu Valiria, por todo o apoio nessa jornada, a pessoa que sempre me encorajou, e me ajudou a aprender a viver nessa cidade.

Ao pessoal do Floripa Patinação Artística, por serem minha segunda família, aqui em Florianópolis, e por serem minha descontração nesses últimos semestres.

Um agradecimento especial ao meu grupo de laboratório LabEC, por todas as ajudas com o conhecimento e apoio durante essa jornada.

Muito obrigada ao meu orientador Gustavo, que me guiou, me encorajou, e que transferiu seu conhecimento, para o meu crescimento, obrigada, eu jamais esquecerei isso.

Obrigada a todos os meus professores, que no decorrer do curso, transmitiram informações e conhecimentos que carregarei para o resto da vida. Uns eu tive mais contato que outros, mas levarei todos com muito carinho, pois contribuíram para a minha formação.

À UFSC, essa instituição que me permitiu ser a pessoa que sou, e que me permitiu me tornar uma profissional em química.

Ao INCT catálise pela ajuda financeira ao nosso grupo de pesquisas.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 Estrutura Capilar..... | 13 |
| FIGURA 2 Fases germinativas do Cabelo..... | 14 |
| FIGURA 3 Estrutura do esqualeno..... | 17 |
| FIGURA 4 Parte da estrutura molecular da melanina..... | 18 |
| FIGURA 5 Estrutura da Cocaína..... | 18 |
| FIGURA 6 Ácido p-hidroxibenzóico e formação de metil, etil, propil, iso-propil e iso-butil parabeno..... | 21 |
| FIGURA 7 Esquema de Detecção pelo método MRM no modo IDA..... | 25 |
| FIGURA 8 Estudo da eficiência da extração de parabenos e esqualeno em cabelos, utilizando metanol e etanol..... | 35 |
| FIGURA 9 Cromatograma da análise de substâncias na cédula monetária..... | 37 |
| FIGURA 10 Cromatograma das transições iônicas da cocaína..... | 37 |
| FIGURA 11 Espectro de massas da cocaína na amostra de dinheiro..... | 38 |
| FIGURA 12 Comparação do espectro da amostra e o espectro presente na biblioteca..... | 39 |
| FIGURA 13 Curva de calibração para o esqualeno..... | 39 |
| FIGURA 14 Cromatograma da análise de esqualeno na amostra..... | 40 |
| FIGURA 15 Cromatograma da amostra de nicotina contaminada de maneira exógena..... | 41 |
| FIGURA 16 Curva de Calibração Metilparabeno e Propilparabeno com detecção por espectrometria de massas | 42 |
| FIGURA 17 Cromatograma da análise de parabenos em cabelo por espectrometria de massas..... | 43 |
| FIGURA 18 Curva de calibração Metilparabeno e Propilparabeno com análise por DAD..... | 45 |
| FIGURA 19 Cromatograma da análise de parabenos por detecção de arranjo de diodos..... | 46 |
| FIGURA 20 Comatograma do padrão de parabenos..... | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 Curva de Calibração por partes do Esqualeno..... | 31 |
| TABELA 2 Curva de Calibração por partes de Parabenos..... | 33 |
| TABELA 3 Limite de quantificação e detecção dos parabenos com detecção por espectrometria de massas..... | 43 |
| TABELA 4 Quantificação de parabenos presente na amostra..... | 44 |
| TABELA 5 Dados relativos à concentração de parabenos na amostra com detecção DAD..... | 47 |
| TABELA 6 Limite de detecção e quantificação dos parabenos detectados por DAD..... | 47 |
| TABELA 7 Comparação dos valores de LQ e LD obtidos a partir das curvas de calibração dos parabenos..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS

EPI - *Enhanced Product Ion*

FAAE – Éster etílico de ácido graxo (fo inglês “fatty acid ethyl ester”)

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês “high performance liquid chromatography”)

IDA - Aquisição Dependente da Informação (do inglês “Information Dependent Acquisition”)

LC - Cromatografia líquida (do inglês “liquid chromatography”)

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês “liquid chromatography coupled to mass spectrometry”)

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

m/z – razão massa/carga

MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas (do inglês, “multiple re- action monitoring”)

MS – Espectrometria de massas (do inglês “mass spectrometry”)

MS/MS – Espectrometria de massas em *tandem*

DAD – Detector de arranjo de diodos

Q1 – primeiro quadrupolo

Q3 – terceiro quadrupolo

s - desvio padrão do intercepto

S - inclinação da curva de calibração

S/R - relação sinal/ruído

RESUMO

A análise em matrizes queratinizadas tem se tornado um campo amplamente estudado pela ciência. O estudo em cabelo revela informações de hábitos cotidianos, vícios e distúrbios, além de ser uma matriz que não é facilmente deteriorada com o tempo. O presente trabalho aborda a determinação de compostos endógenos, presentes na matriz natural do cabelo, como o esqualeno, e análises endógenas de compostos adquiridos de maneira voluntária, como drogas de abuso. Os compostos exógenos também podem ser classificados de acordo com o tipo de contaminação, seja ela voluntária ou involuntária. Por exemplo, pelo uso de cosméticos e por exposição à ambientes contaminados ou poluídos, respectivamente. O trabalho traz ainda estudos de métodos cromatográficos existentes para uma análise mais eficiente para esse tipo de amostra. Para comprovação do método cromatográfico para determinação de drogas, utilizou-se cédula monetária, e amostra de cabelo contaminada na parte exógena por nicotina. A desvantagem do uso de cabelos como fonte de análise, é a diferenciação entre a contaminação exógena e endógena, assim fez-se uma diferenciação das duas, além da determinação e quantificação de esqualeno, composto endógeno presente no cabelo, e parabeno, uma contaminação exógena, proveniente de produtos cosméticos. Para a extração dos compostos presentes na amostra, fez-se estudos baseados nas literaturas existentes de solventes mais adequados, assim como, estudos em relação ao tempo de extração. A determinação dos compostos orgânicos foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, sendo o esqualeno detectado por arranjo de diodos, assim também como os parabenos. Por fim detectou-se parabenos por espectrometria de massas, para haver um parâmetro comparativo entre os dois detectores utilizados.

Palavras chave: cromatografia líquida, esqualeno, parabenos, matrizes queratinizadas.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 13 |
| 2.1 Composição do cabelo..... | 13 |
| 2.2 Estrutura do cabelo..... | 13 |
| 2.3 O cabelo como amostra..... | 15 |
| 2.3.1 Determinação de compostos endógenos..... | 16 |
| 2.3.2 Determinação de compostos exógenos..... | 19 |
| 2.4. Cromatografia de alta eficiência..... | 22 |
| 2.4.1 Detectores – Espectrômetro de massas..... | 23 |
| 2.4.2 Detectores – Arranjo de Diodos..... | 24 |
| 2.4.3. Método de Análise cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para a determinação drogas..... | 25 |
| 3 OBJETIVOS..... | 26 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 26 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 26 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 4.1 Solventes Utilizados..... | 27 |
| 4.2 Instrumentos..... | 27 |
| 4.2.1 Instrumentos de preparação de amostras..... | 27 |
| 4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas..... | 27 |
| 4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao arranjo de diodos..... | 28 |
| 4.3 Procedimento experimental..... | 29 |
| 4.3.1 Progressão do trabalho | 29 |
| 4.3.2 Cédula Monetária..... | 29 |
| 4.3.3 Amostra de nicotina..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 4.3.4 Determinação do tempo de extração e solvente para a posterior construção da curva de calibração e preparo de amostras..... | 30 |
| 4.3.4.1 Curva de Calibração do Esqualeno..... | 31 |
| 4.3.4.2 Curva de Calibração dos Parabenos..... | 32 |
| 4.3.4.3 Preparação das amostras para análise..... | 33 |
| 4.4 Segurança no laboratório e tratamento de resíduos..... | 33 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 35 |
| 5.1 Testes para determinação do preparo de amostras..... | 35 |
| 5.2 Determinação de compostos endógenos..... | 36 |
| 5.2.1 Determinação de cocaína em cédulas monetárias | 36 |
| 5.2.2 Determinação de Esqualeno em Cabelo..... | 39 |
| 5.3 Determinação de compostos exógenos..... | 41 |
| 5.3.1 Determinação de Nicotina..... | 41 |
| 5.3.2 Determinação de Parabenos..... | 41 |
| 5.3.2.1 Quantificação de parabenos na amostra por espectrometria de massas..... | 42 |
| 5.3.2.2 Quantificação de parabenos por DAD..... | 44 |
| 5.3.2.3 Comparação das técnicas de detecção LC/MS e UV-DAD para a determinação de parabenos..... | 48 |
| 6 CONCLUSÃO | 50 |
| 7 REFERÊNCIAS | 51 |
| I ANEXOS..... | I |
| II APÊNDICES..... | V |

1 Introdução

O estudo do uso de cabelo como amostra para análise não é recente, mas têm se tornado cada vez mais usual no âmbito de investigações toxicológicas. No Brasil o mesmo começou a ser difundido amplamente com a Lei Nº 13.103/2015, Art.5º, onde é obrigatório a apresentação de exame toxicológico, para motoristas profissionais, para renovação da carteira de condutores. Utilizando como material de amostra, matrizes queratinizadas, como pelos e cabelos.

A análise endógena, análise feita para determinar compostos no interior dos fios, é o método utilizado para analisar substâncias tóxicas. Sob essa perspectiva de análises endógenas, encontram-se duas subdivisões, as análises endógenas de substâncias presentes de maneira involuntária, como metabólitos naturais do cabelo, por exemplo o esqualeno, e as substâncias adquiridas voluntariamente, ou seja, substâncias nas quais a pessoa fez uso, como medicamentos, drogas e alimentação.

Um grande impasse encontrado na análise de cabelos é a contaminação externa, a análise feita na parte externa do fio do cabelo, que é a contaminação proveniente de poluição, contato com fumaça, contato dos cabelos com as mãos, assim também como o uso de cosméticos. Para tal, também se divide a análise exógena em duas subdivisões, sendo elas a contaminação involuntária, como o contato com a fumaça de cigarros, contato com as mãos, com o ambiente externo, e, também, a contaminação voluntária, aquelas nas quais o usuário decide o uso, como o uso de cosméticos que possuem parabenos, por exemplo.

O cabelo se tornou alvo de determinação toxicológica devido ao fato de que esse tipo de amostra não é degradada facilmente. O mesmo traz ainda informações sobre os hábitos de vida dos indivíduos analisados, e também pode ser utilizado como estudo metabolômico.

O trabalho atual visa a análise de compostos orgânicos em matrizes biológicas, com enfoque em matrizes queratinizadas. Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, tendo em vista que essa é uma técnica compatível a análise de amostras que contenham baixos teores dos compostos alvo.

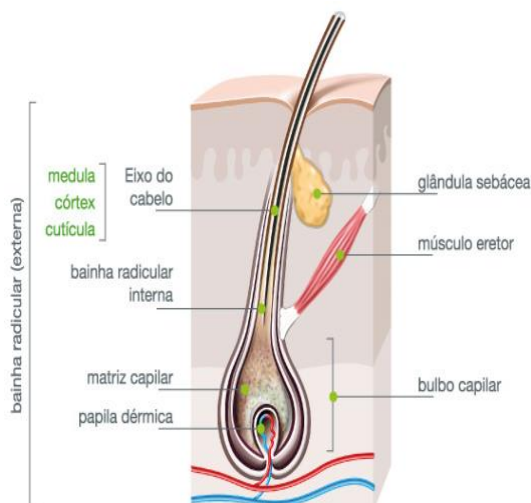
2 Revisão da Literatura

2.1 Composição do cabelo

O Cabelo é composto de 65 a 95% de proteínas, sendo a queratina a proteína mais presente, por isso que o mesmo pertence ao grupo das fibras denominadas α -queratina. As queratinas são formações polipeptídicas e possuem um alto teor de pontes dissulfeto. Já as proteínas são polímeros de condensação ou macromoléculas formadas por uma sequência de 15 a 20 tipos de aminoácidos¹. Esses aminoácidos sofrem frequentemente reações químicas, provenientes de clareamento, alisamento, exposição solar, formando outras substâncias ou derivados². Os elementos químicos presentes no cabelo em maior quantidade são o carbono, oxigênio, nitrogênio, hidrogênio e enxofre, além de elementos traços como ferro, zinco, iodo, cobre e alumínio¹. Já a parte que produz o sebo do cabelo é composta por ácidos graxos, esqualeno, cera e glicerídeos, presentes na parte endógena do fio³.

2.2 Estrutura do cabelo

Figura 1. Estrutura Capilar.



Fonte: MERZ (acesso 2018)⁵

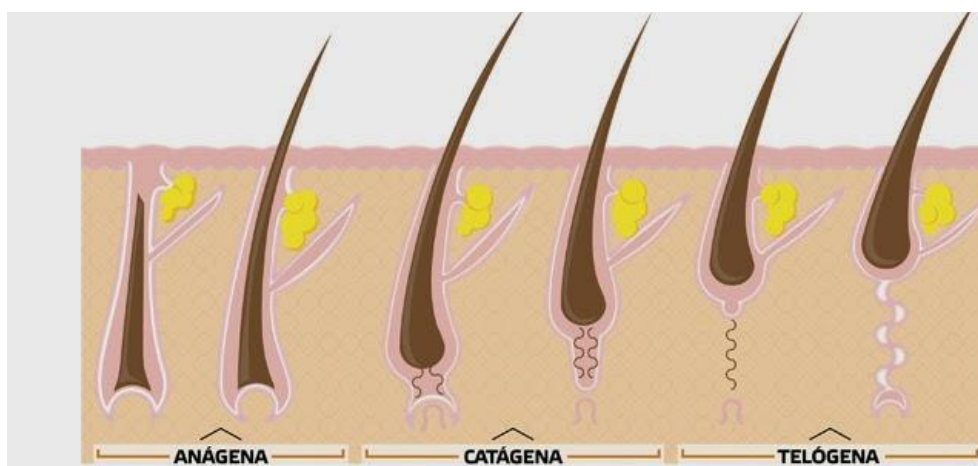
O cabelo é dividido em duas partes, sendo elas a haste capilar e o folículo piloso. O segundo encontra-se na parte inferior do fio, como mostra na Figura 1, a parte em contato com os vasos sanguíneos. O mesmo é composto da bainha epitelial e da bainha de tecido conjuntivo. O folículo piloso não apresenta um crescimento contínuo e cada fibra capilar, se encontra nas fases de crescimento em diferente período de tempo⁴.

As três fases de crescimento são as fases anágena, catágena e telógena,

sendo a de maior interesse a anágena, na qual acontece o processo de crescimento do cabelo e é a fase ativa do crescimento capilar (essa fase dura em torno de 2 a 6 anos), que é a fase onde as drogas são adsorvidas no cabelo.

Nessa fase o bulbo do folículo permanece em contato com os vasos sanguíneos⁴. Assim permite que haja a transferência dos fármacos e entorpecentes até os fios, como pode ser visto na Figura 2, onde na fase anágena percebe-se o contato dos fios com a corrente sanguínea. Após a fase anágena os fios entram em uma fase de transição de curto período (3 a 4 meses), e a última fase de crescimento dos fios é a telógena, que é onde os fios morrem e caem, para assim iniciar um novo ciclo⁶.

Figura 2. Fases germinativas do cabelo



Fonte: PEREIRA (acesso 2018)⁷

A haste capilar é a parte superior acima do bulbo, como mostrado na Figura 1. É composta de fibra capilar e principalmente α -queratina (dependendo do cabelo de 65-95% de massa)⁴. A haste capilar é composta de medula, que é uma parte pouco compactada, a mesma é circundada pelo córtex, uma região rica em fibras e este é constituído de proteínas e lipídeos. Circundando o córtex têm-se uma camada externa, denominada de cutícula, essa camada é composta por células mortas sobrepostas, nas quais formam a camada protetora do cabelo⁸.

A parte de maior interesse de estudo é a parte do folículo piloso, já que o folículo piloso possui em sua base um bulbo piloso e esse bulbo é o que contém a fase germinativa que é responsável pelo crescimento capilar. Sendo a fase de crescimento a anágena por estar em contato com os vasos sanguíneos⁹. Assim, após a ingestão de entorpecentes, fármacos, as substâncias são transferidas para o cabelo através das artérias e das veias para os folículos durante a fase de crescimento¹⁰.

2.3 O cabelo como amostra

Alguns autores dizem que o cabelo é o “espelho do ambiente” ao qual o indivíduo foi exposto. Já que com esse tipo de amostra a determinação é possível, por devido a uma longa exposição ao composto químico ou pela ingestão. Baumgartner, 1979, foi uma das primeiras publicações que trouxe ao mundo científico a análise em cabelos. Ele determinou a concentração de opiáceos no cabelo humano através de extração com metanol e detecção por radioimunoensaio¹¹. Anos antes em 1945, Flesch havia proposto que o cabelo tinha grande potencial de ser utilizado como material de biópsia, já que o mesmo é um órgão excretor¹². Um grande marco da pesquisa nesse tipo de matriz se deu pela morte de Napoleão Bonaparte, onde foi realizado a análise em seu cabelo e foi constatada a presença de As (arsênio), que ligou-se as proteínas do cabelo¹³.

Estudos recentes mostraram que o cabelo não é degradado facilmente quando exposto ao meio ambiente e os analitos presentes no mesmo perduram por anos. Como foi mostrado quando analisado o cabelo de um antigo peruano, datado de 1000 A.C. e encontrou-se cocaína, benzoilecgonina (metabólito da cocaína) e ecgonina metilester¹⁴.

Sabe-se que o cabelo é uma amostra muito utilizada principalmente para o âmbito forense, mas a problemática desse tipo de amostra se deve à diferenciação entre a contaminação endógena e exógena. A exógena se da quando o indivíduo é exposto a um ambiente com fumaça (do cigarro por exemplo e assim fica adsorvido no cabelo, a nicotina) ou até mesmo o contato

das mãos com o cabelo pode vir contaminar a amostra exógenamente. A contaminação endógena acontece quando o indivíduo usa certa substância e essa substância é transferida para o cabelo pelos vasos sanguíneos.

2.3.1 Determinação de compostos endógenos

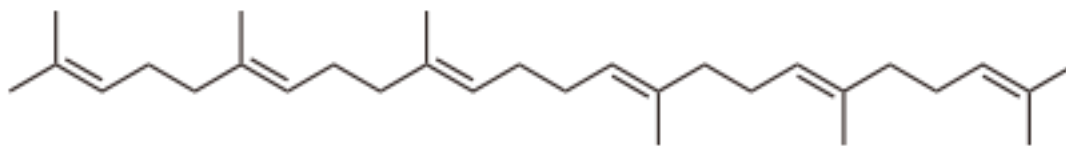
A análise endógena em cabelos se dá, a partir do estudo no interior do fio, sem interferência externa, esse tipo de análise pode ser dividida em dois grupos, sendo eles os de adsorção involuntária, como compostos encontrados naturalmente nos fios, e o de adsorção voluntária, que são compostos encontrados no interior dos fios, mas esses são previamente ingeridos pelo indivíduos. Essas análises variam de pessoa para pessoa, já que os hábitos de vida são diferentes, como alimentação e tratamentos cosméticos. Assim, traz-se um estudo de esqualeno, um composto natural presente no cabelo, proveniente do sebo.

Esqualeno é um composto natural, um dos precursores de vários hormônios em animais e esteróis em plantas¹⁵. Foi descoberto por Tsujimoto Mitsumaru em 1916, um japonês, no qual descreveu o composto como uma molécula altamente insaturada. O esqualeno é triterpeno linear sintetizado em plantas, animais, e fungos, precursor da síntese de metabólitos secundários, como esteróis, hormônios ou vitaminas. Ele é também uma fonte de carbono na fermentação de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos¹⁶.

No corpo humano é secretado pelas glândulas sebáceas para a proteção da pele, o mesmo confere o brilho e a elasticidade da pele. É também encontrado na gordura do cabelo e no sebo (secreções de glândulas sebáceas)¹⁵.

O esqualeno é um óleo transparente, é uma cadeia de hidrocarbonetos formada por seis unidades de isoprenos, que quando ligados são chamados de triterpeno que dá a característica de lipídeo ao esqualeno¹⁵.

Figura 3. Estrutura do Esqualeno



Fonte: POPA (2015)¹⁶

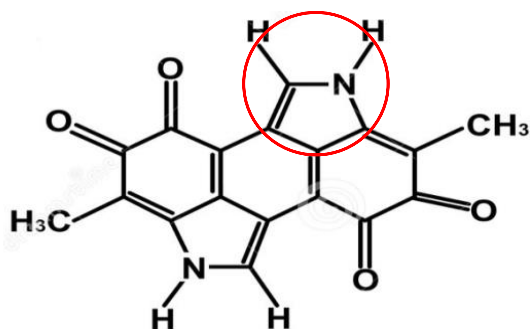
Muitos são os produtos cosméticos que tem em sua formulação o esqualeno, já que quando absorvido pela pele, restaura sua elasticidade e flexibilidades naturais, sem deixar resíduos oleosos. Essas características fazem dele um excelente protetor de pele, sendo usado para cabelos danificados, proteção antienvelhecimento e rugas¹⁶.

V. Auwärter et al, estudaram como o esqualeno pode ajudar na determinação de éster etílico de ácido graxo (FAEE do inglês, éster etílico de ácido graxo), que é incorporado no cabelo a partir do sebo. Mas mesmo usando esse marcador, os resultados variavam de acordo com os cuidados do cabelo, assim também como hábitos de vida. Assim analisou-se que o erro era diminuído quando era relacionado a concentração relativa de FAEE com esqualeno, como composto de referência natural fosse usada para interpretação. Assim, mostrou que o esqualeno permite um controle do conteúdo lipídico do cabelo¹⁷.

Um outro tipo de análise pode ser feita no interior do fio que é a análise na qual os compostos analisados não são encontrados naturalmente no cabelo, esses são provenientes da ingestão, de alimentos, fármacos, drogas entre outros compostos.

No caso de determinação de cocaína em cabelo, o folículo piloso retrata a história do uso do entorpecente e também permite uma estimativa do tempo/período de uso até o dia da análise¹⁸ (anexo A, página I).

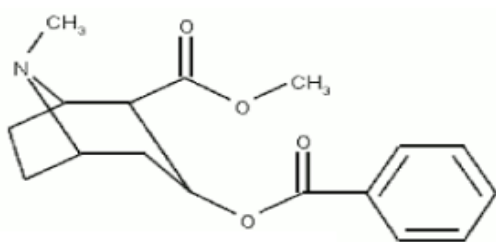
Figura 4. Parte da estrutura molecular da melanina, sendo destacado o grupo Indol, responsável pelas interações moleculares com as drogas.



Fonte: DREAMSTIME. Molécula da melanina. Disponível em: <<https://pt.dreamstime.com/imagens-de-stock-royalty-free-molécula-da-melanina-com-fórmula-química-image22818629>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

Uma outra parte importante do cabelo são os melanócitos, que são células presas no topo da papila dérmica, que produzem a melanina, um pigmento¹⁹. As melaninas são divididas em dois grupos: as eumelaninas (coloração marrom a preta) e as feomelaninas (coloração amarela a vermelha). As diferentes proporções de eumelaninas e feomelaninas vão causar as variações de pigmentação do córtex, assim também como a composição química do mesmo²⁰.

Figura 5. Estrutura da cocaína



Fonte: ARAÚJO, Daniele Ribeiro de; PAULA, Eneida de; FACETO, Leonardo Fernandes. Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. Química Nova. São Paulo, p. 1775-1783. 2008.

A melanina (figura 4) é uma das responsáveis pela interação molecular com o sítio ativo das drogas. As estruturas moleculares das drogas fazem com que haja atração eletrostática entre os grupamentos aromáticos das mesmas e o grupo indol (destacado na figura) da melanina e forças de van der Waals²⁰. A cocaína (figura 5) apresenta esse tipo de grupo, assim é transportada mais facilmente até o bulbo capilar, devido a esse fato é mais fácil encontrar cocaína

sem sofrer reações metabólicas (reações que acontecem no organismo e forma benzoilecgonina, por exemplo) no cabelo que em sangue ou urina (anexo B, página II)²¹.

Bertol et al, analisaram GHB, um neurodepressor de vários nomes populares diferentes, dentre elas Georgia Home Boy, Líquido G, Líquido X, Fantasia. Na Europa e nos Estados Unidos é utilizado como medicamento para tratamento de narcolepsia com cataplexia, e ainda na Europa é utilizado como coadjuvante no controle da síndrome de abstinência alcoólica. Trinta voluntários

foram selecionados, os mesmos foram divididos por cores de cabelos (10 com cabelos loiros, 10 pretos e 10 tingidos com outras cores), todas as amostras eram de não usuários. Outros 12 voluntários foram analisados, esses também nunca usaram a droga, uma dose do comprimido foi dissolvido em água e ingerida pelos voluntários, as amostras foram coletadas na sequência, após um mês e após dois meses. As amostras foram digeridas em NaOH, resfriadas em temperatura ambiente e adicionada H_2SO_4 e etil acetato, agitado e centrifugado. O sobrenadante foi seco e reconstituído de fase móvel e injetado. A maior absorção se deu no grupo de cabelos tingidos²².

Hutter et al, identificaram 22 canabinoides sintéticos em cabelos humanos, as amostras foram lavadas com acetona, éter de petróleo e água, sob agitação. As mesmas foram secas e cortadas em pequenos pedaços (1-2 mm), uma solução de padrão interno foi adicionada em 50 mg de cada amostra e adicionado etanol que permaneceu em banho de ultrassom. Posteriormente, 1 mL do extrato foi transferido para um vial, e seco sob fluxo de nitrogênio, ao resíduo seco no vial adicionou-se um reconstituente de fase móvel. As amostras foram obtidas de um centro forense psiquiátrico de pacientes na qual sabia-se previamente do uso de canabinoides²³.

Um estudo feito em amostras fortificadas com padrões internos em cabelos sendo identificado THC, morfina, codeína, anfetamina, metanfetamina, benzoilecgonina, cocaína, dentre outros. As amostras foram lavadas com diclorometano, secas sob fluxo de nitrogênio e cortadas em pequenos pedaços. A esses pedaços adiciona-se metanol e uma solução de padrão interno, a amostra permaneceu incubada por 15h. A fase orgânica é retirada e uma alíquota é injetada²⁴.

2.3.2 Determinação de Compostos Exógenos

A determinação de compostos exógenos se dá no interior do fio e também pode ser divididos em adsorções involuntárias e voluntárias, no primeiro caso se dá quando a contaminação provém da fumaça e no segundo contaminação proveniente de cosméticos.

Estudos mostram que essas análises exógenas trazem importantes resultados para a sociedade. Como a análise para a determinação de elementos de metais pesados, um estudo realizado, analisou o cabelo como indicador do nível de poluição da cidade de Vitória (ES). O estudo do cabelo, e dos elementos traço que são encontrados no mesmo, pode servir como estudos metabólicos²⁵.

Podem ainda definir os hábitos de vida das pessoas, e revelar episódios passados relevantes à saúde, mesmo que esse hábito de vida não seja mais presente na vida da pessoa. A concentração de elementos traços podem também ser utilizadas para avaliar distúrbios de aprendizagem, nutricionais, além de poder avaliar doenças e distúrbios metabólicos¹³.

A determinação exógena por adsorção voluntária se dá por meio da extração dos compostos presente nos fios, sem a lavagem prévia. Parabenos podem ser encontrados em cabelos por meio da análise exógena e por escolha do usuário, já que em muitos produtos cosméticos são encontrados parabenos.

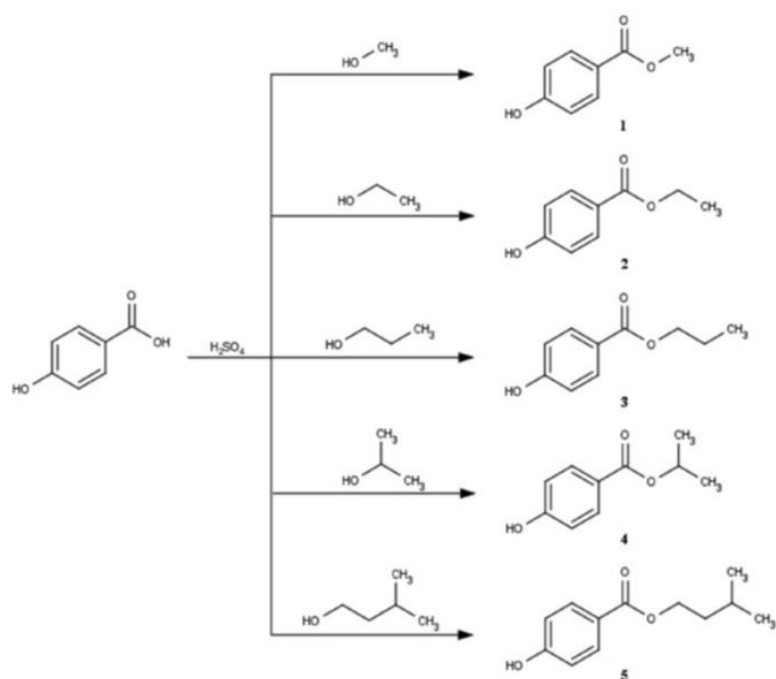
Os cosméticos estão no uso diário da maioria das pessoas, sob forma de shampoos, condicionadores, cremes, maquiagens, entre diversos outros usos. Por estarem tão presente na vida das pessoas, há uma grande preocupação perante a segurança dos produtos, como os compostos utilizados para a fabricação dos mesmos²⁶.

Os parabenos são utilizados como conservantes de produtos cosméticos, o qual protegem da ação de microorganismos no processo de fabricação, assim também no momento da aplicação. A proteção é necessária devido a grande população de microorganismos (bactérias, fungos) presentes em peles e cabelos, podendo levar a proliferação de doenças, dermatites. Os parabenos são amplamente utilizados, pois os mesmos possuem um amplo espectro antimicrobiano e também tem um baixo custo^{26,27,28}.

Parabenos são ésteres sintéticos e são obtidos através da esterificação do ácido p-hidroxibenzóico, como representado na Figura 6. Além de apresentarem um grande espectro antimicrobiano, os parabenos também são incolores, inodoros, insípidos e solúveis em água. Pesquisas apontam que

quanto maior a cadeia carbônica do parabeno, maior a atividade antimicrobiana, conseqüentemente menor a solubilidade em água. A maioria dos parabenos encontrados em produtos cosméticos são o metil parabeno e o propil parabeno^{28,29}.

Figura 6. Ácido p-hidroxibenzóico e formação de metil, etil, propil, iso-propil e iso-butil parabeno.



Fonte: FERNANDES et al (2013)²⁹

Mesmo sendo um forte microbicida, o mecanismo de ação antimicrobiana é muito complexo e ainda desconhecido, sabe-se apenas que os mesmos podem atuar na síntese de DNA e RNA (enzimas chaves, como ATPses), ou no transporte pelas membranas²⁹.

Como mostrado, os parabenos são de grande utilidade na fabricação de produtos cosméticos, mas, muitos estudos estão sendo em torno dos efeitos tóxicos que os mesmos podem apresentar. Os efeitos mais comuns são reações alérgicas e hipersensibilidade, mas, estudos mais aprofundados estão relacionando o uso de parabenos com o câncer de mama, já que os parabenos

são considerados desreguladores endócrinos, ou seja, possuem uma atividade estrogênica. Os desreguladores endócrinos podem causar, diferenciação sexual, diminuição da produção de espermas, alteração no tecido do ovário, podendo causar câncer de mama e no colo do útero^{30,31}.

De acordo com Coelho et al ²⁸ isso acontece devido ao fato que parabenos e estrógenos tem uma estrutura semelhante (OH fenólicos, fragmentos hidrofóbicos). Podendo assim, os parabenos serem considerados, pelo organismo, como substitutos potenciais do hormônio natural, o que pode causar o estímulo a resposta do receptor estrogênico e também interações com o receptor estrogênico, devido a esse fato é classificado como um desregulador endócrino^{30,31}.

Para tal alguns países restringiram o uso de parabenos como a Dinamarca, após algum tempo a união Européia, também restringiu o uso de alguns deles. Assim, a alternativa foi o uso de outros compostos em substituição aos parabenos, outros tipos de conservantes, dentre eles liberadores de formaldeído, formadores quelantes, como EDTA, que melhoram a estabilidade de produtos cosméticos e são uma alternativa para cessar o uso de parabenos em produtos cosméticos³².

2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

É uma técnica de separação e quantificação de compostos. A técnica utiliza pequenas colunas (fase estacionária) contendo materiais preparados para a separação desejada e também uma fase móvel eluída sob altas pressões³³.

O equipamento é composto por bombas, uma coluna cromatográfica, detector e um registrador, sendo esse um computador. A técnica necessita da utilização de bombas que deve suportar a altas pressões, além de proporcionar uma vazão constante através da coluna³³.

O analito deve interagir com a fase móvel mas sem a ocorrência de reação química. A mesma deve ter baixa viscosidade e ter uma polaridade adequada. Na escolha da fase móvel pode-se utilizar diferentes proporções de diferentes

solventes, a fim de que tenha uma diferença de polaridade e assim propiciar a separação.

A fase estacionária deve ter uma polaridade adequada e também ser compatível com o tipo de analito a ser analisado, para que assim ocorra uma separação adequada. Para a molécula do analito ser adsorvida na fase estacionária uma molécula da fase móvel deve ser deslocada da superfície da fase estacionária. Se a coluna é de sílica, por exemplo, compostos polares irão ficar fortemente retidos e assim irão deslocar a molécula da fase móvel³³.

2.4.1 Detectores – Espectrômetro de Massas

Os analisadores de massa mais comuns são: single quadrupolo, triplo quadrupolo, tempo de voo e íon trap.

O triplo quadrupolo, utilizado nesse trabalho, é o sistema de QTrap que utiliza dois quadrupolos de filtros de massas iguais, o Q_1 e Q_3 e uma célula de colisão Q_2 . A separação é feita quando os íons entram no primeiro quadrupolo, onde o mesmo irá separar ou filtrar de acordo com a razão massa/carga dos íons, esse quadrupolo permite que apenas um íon com determinada m/z seja selecionado. No segundo quadrupolo esse íon é fragmentado por colisão com moléculas de um gás, no processo de dissociação induzida por colisão³⁴.

Esses íons fragmentados são transmitidos para o terceiro quadrupolo que são filtrados novamente e detectados, gerando assim um espectro de massas³⁴.

O Qtrap é um equipamento que traz a potencialidade de usar o método IDA (do inglês, Information Dependent Acquisition) que traz um ganho no que diz respeito a confiabilidade na identificação das espécies³⁵. O IDA é uma extensão do Analyst™ (software utilizado para as análises no QTrap), essa configuração do software que maximiza o número de informações obtidas em apenas uma corrida cromatográfica³⁶.

Inicialmente é feita uma varredura simples MS, as massas são analisadas com relação a intensidade do íon, ou o isótopo pai. Após escolher as massas “candidatas”, faz-se a análise utilizando-se o IDA, que é uma varredura

dependente dos dados (massa, energia de colisão), maximizando então as informações de fragmentação³⁶.

Pode-se dizer que o IDA é uma inteligência artificial, que quando se faz uma varredura dependente de informação (IDA) em duas diferentes energias de fragmentação, dois espectros de dois íons produtos de dissociação são gerados. Assim os espectros ricos em informação são obtidos a partir de íons não conhecidos de antemão³⁵.

Em comparação com uma análise normal, é feito uma varredura MRM (do inglês, multiple reaction monitoring) onde na mesma é identificado o íon precursor (ou íon pai), no primeiro quadrupolo Q_1 ele é identificado, quando passa para o Q_2 , que é uma célula de colisão, ele é fragmentado em seu maior íon, que passa para o terceiro quadrupolo Q_3 , um outro filtro igual o Q_1 , esses filtros servem para retirar quaisquer outras moléculas que não são do interesse da análise. Após passar pelo terceiro quadrupolo ele é identificado e gera um espectro. Sabendo então do íon precursor e de sua fragmentação é feita outra corrida com base nos dados obtidos, e assim obtém-se dados e espectros do íon fragmentado³³.

2.4.2 Detectores – Arranjo de Diodos (DAD)

O funcionamento é baseado na passagem de radiação eletromagnética pela amostra e a mesma tendo uma absorvância da luz, esse fenômeno geralmente acontece no infravermelho ou no ultravioleta, em um determinado comprimento de onda³³. A resposta é seletiva, já que só serão detectados nos comprimentos de onda selecionados previamente³⁷. A radiação de uma lâmpada de baixa pressão é transmitida, por uma cela da amostra. A quantidade de radiação não absorvida irá atingir uma célula fotoelétrica da amostra. A radiação da fonte é dirigida através de um divisor de feixe para a cela de referência que atravessa a mesma e atinge uma célula fotoelétrica de referência. A diferença de corrente das células fotoelétricas irá alimentar um amplificador gerando o sinal que é proporcional a concentração do analito³³.

Dentro do detector de uv-vis possui ainda outros tipos de detectores acoplados, como o de arranjo de diodos (DAD). Nesse detector a luz irá passar pela cela. A luz é dispersada e os comprimentos de onda são focalizados em uma rede de diodos (256 a 1024nm). Assim, pode-se escolher um cromatograma de um determinado comprimento de onda, obtendo-se o cromatograma do analito que absorve melhor naquele comprimento de onda específico. Pode-se ainda produzir uma série de espectros³⁷.

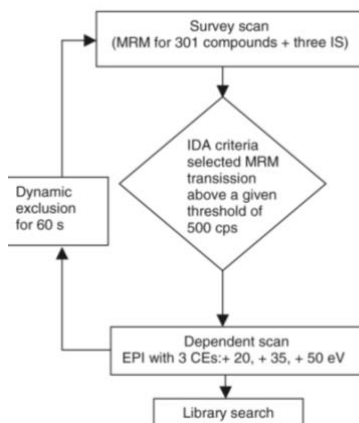
2.4.3. Método de Análise cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para a determinação drogas

Para as análises no sistema QTrap foi utilizado o modo de ionização positivo, utilizando o IDA. Utilizou-se um método cromatográfico previamente publicado por Muller et al. Para tal, foi selecionada a varredura MRM.

No método a intensidade limite do IDA foi de 500 contagens por segundo (cps). A varredura dependente foi uma varredura EPI, realizada em três energias de colisão diferentes. A exclusão dinâmica, que define o tempo para o qual uma transição é excluída após uma varredura de EPI foi de 60s. Os espectros foram pesquisados na literatura de massas³⁶.

O processo de análise no método MRM, para substâncias toxicológicas no modo IDA, segue o seguinte processo da Figura 6.

Figura 7. Esquema de detecção pelo método MRM no modo IDA



Fonte: MULLER et al (2005)³⁶

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Determinar compostos orgânicos em amostras de cabelos, provenientes da contaminação endógena e exógena, com o fim de determinar metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno e esqualeno, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.

3.2 Objetivos específicos

- ° Testar os preparos de amostras com o intuito de aprimorar os estudos visando na eficiência, viabilidade e rapidez das extrações.
- ° Estudar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas para a determinação dos analitos em cabelos.
- ° Aplicar o método IDA com o intuito de maximizar o número de informações a serem analisadas em uma única corrida.
- ° Avaliar a presença de cocaína em cédulas monetárias e com a aplicação do método IDA de determinação.
- ° Determinar o esqualeno, como sendo o composto orgânico endógeno, através da cromatografia líquida com detecção de arranjo de diodos.
- ° Determinar parabenos em matrizes queratinizadas, sendo esse o composto orgânico exógeno, através da cromatografia líquida com detecção de arranjo de diodos e espectrometria de massas.
- ° Comparar os métodos propostos neste trabalho para a determinação de parabenos, através dos limites de detecção e quantificação.
- ° Avaliar amostra contaminada de maneira exógena, para verificar possíveis interferentes e contaminação por exposição à fumaça.

4 Material e Métodos

4.1 Solventes Utilizados

Todos os solventes utilizados (etanol, metanol, água, acetonitrila) para a execução desse trabalho foram de marca Synth, Vetec, Tedia, e a água deionizada ultrapura obtida por um sistema de purificação MILLI-Q (Milli - Q deionizer, Millipore, Bedford, MA, EUA), nos quais foram utilizados para as extrações realizadas. Outros solventes de mesma marca foram utilizados para as lavagens e retirada de contaminação exógena das amostras biológicas, nas quais serão comentadas sucessivamente. Os padrões de metil, etil, propil e butilparabenos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil) assim também como o padrão de esqualeno.

4.2 Instrumentos

4.2.1 Instrumentos de preparação de amostras

Para a preparação das amostras de cabelos, foram utilizados, ultrassom (marca Cristófoli, modelo Cuba de Ultra-som Cristófoli), agitador (marca KASVI, modelo K40-10208), balança de precisão analítica (marca SHIMADZU, modelo AX200) disponíveis no laboratório de eletroforese capilar (LabEC), local onde o trabalho foi realizado.

4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

Os analitos foram separados das amostras extraídas dos fios de cabelo por cromatografia líquida de alta eficiência. O equipamento utilizado foi Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, AL).

O sistema de cromatografia líquida foi acoplado a um espectrômetro de massas triploquadruplar API 3200™, Applied Biosystems/ MDS Sciex, (Sciex, Concord, CA), sendo a cela de colisão LINAC® e fonte de ionização Turbo V™,

no modo TurbolonSpray®. O tratamento de dados foi realizado com o *software* Analyst versão 1.6.3.

Os analitos (nicotina, cocaína e parabenos) foram separados em uma coluna de marca Phenomenex modelo Synergi Polar-RP com comprimento de 150 mm, diâmetro interno de 2 mm e tamanho da partícula igual a 4 µm, com a utilização do modo gradiente de eluição para a nicótica e cocaína, onde a melhor composição para a fase móvel foi obtida com as proporções de 50% de solvente A (metanol:H₂O (95:5 v/v)) e 50% de solvente D (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%). Os analitos foram eluídos em tempo inferior a 10 minutos.

Para análise de parabenos o modo gradiente foi utilizado onde nos primeiros 5 minutos têm-se 60% de solvente A (metanol:H₂O (95:5 v/v)) e 40% de solvente D (acetonitrila), 5 minutos com 10% de A e 90% de D, 2 minutos 60% de A e 40% de D, até o final da corrida em 12 minutos.

4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao arranjo de diodos

No método de análise por arranjo de diodos, foram analisados parabenos e esqualeno. Os parabenos foram analisados por DAD, para mostrar que é um método eficaz para a identificação do mesmo. O esqualeno pode ser analisado apenas por DAD, porque o mesmo não é ionizável, não podendo ser identificado pela espectrometria de massas.

Os comprimentos de onda monitorados, foram de 270 nm para os parabenos e de 200 nm para a determinação do esqualeno.

As amostras foram injetadas no modo gradiente de eluição, sendo no primeiro minuto 60% do solvente A (metanol:H₂O (95:5 v/v)) e 40% de solvente D (solução aquosa de ácido fórmico 0,1%) permanecendo até o terceiro minuto, aos 3 minutos 95% de D e 5% de A permanecendo até os quinze minutos. Após 15 minutos até 25 minutos 60% de D e 40% de A.

4.3 Procedimento Experimental

4.3.1 Progressão do trabalho

O intuito inicial do trabalho foi a determinação de drogas em cabelos humanos, para a comprovação do uso do entorpecente. No entanto, devido a licitude que esse tipo de amostra traz, assim também como a obtenção das mesmas, algumas alternativas foram feitas para a replicação do processo.

Sendo assim, como prova de conceito performance do método cromatográfico sugerido, mostrando que o método é capaz de determinar drogas, independente da amostra na qual ela foi extraída, foi determinado cocaína em cédulas monetárias, já que sabia-se previamente que o analito era presente nesse tipo de amostra. A partir dessa análise, pôde-se mostrar que o método sugerido é eficiente para a determinação de compostos toxicológicos.

Como as drogas provenientes de ingestão, são encontradas no interior do fio, ou seja, na parte endógena, como alternativa para a substituição para a falta de amostras, esqualeno, que é um composto endógeno, foi determinando, mostrando que é possível determinar um composto no interior do fio com as extrações que serão propostas no trabalho.

O cabelo é uma amostra que é facilmente contaminada, sendo difícil a diferenciação entre a contaminação endógena e exógena, com o intuito de mostrar que realmente muitos compostos ficam adsorvidos na parte externa do cabelo, foi identificado nicotina e parabenos no exterior do fio.

4.3.2 Cédula Monetária

Para parâmetro de comprovação do método cromatográfico de análises toxicológicas, fez-se uma análise de cocaína em cédulas monetárias. Para tal, utilizou-se uma nota de dois reais, a mesma foi inserida em um falcon e adicionou-se 2 mL de acetonitrila, mantida em imersão por 5 minutos, uma alíquota foi retirada e injetada no LC/MS/MS. Após a extração a nota foi seca novamente.

4.3.3 Amostra Nicotina

Ainda para parâmetro de comprovação do método, uma amostra de cabelo preto foi submetida a fumaça de tabaco, contaminando a amostra exógenamente. Uma mecha de cabelo foi colada (com fita adesiva) na borda de um kitassato, o mesmo foi conectado ao vácuo e o bocal superior foi vedado com tampa de silicone, que possui apenas uma abertura, nessa abertura queimou-se 6 cigarros e a amostra ficou em contato com a fumaça. Após a contaminação da amostra, pesou-se 105 mg de cabelo, cortado em pequenos pedaços, foi colocado em um eppendorf e adicionou-se 1 mL de metanol, uma alíquota da fase aquosa foi transferida para um vial e analisada no LC/MS/MS. Utilizando o mesmo método de análise toxicológica, pode-se identificar o pico da nicotina.

4.3.4 Determinação do tempo de extração e solvente para a posterior construção da curva de calibração e preparo de amostras

A fim de definir o solvente e o tempo de extração, realizaram-se alguns testes, no qual foram baseados na literatura estudada. Assim, como trazem a grande maioria dos artigos publicados, as extrações em cabelos são realizadas com etanol e metanol, em diferentes tempos, trinta minutos, uma hora, duas horas e quarenta e oito horas de extração.

Para a primeira extração pesou-se no primeiro eppendorf 105 mg de cabelo loiro e adicionou-se 1 mL de metanol, no segundo eppendorf a massa de cabelo loiro foi de 104,3 mg e etanol foi utilizado para a extração.

Agitou-se a mistura em um agitador de placa, com capacidade de até 6 eppendorfs, de marca KASVI por 30 minutos, passado o tempo, retirou-se uma alíquota de 100 μ L de cada amostra e então inserido em um vial para a análise. As amostras que foram retiradas alíquotas, 100 μ L de solvente foram repostos nas mesmas. Estas então ficaram 1h sob agitação, terminado a agitação retirou-se 100 μ L de cada e adicionou-se mais 100 μ L do solvente, permanecendo 2h

sob agitação. Ao fim retirou-se os últimos 100 µL de cada amostra, os solventes foram repostos e ficou sob extração por 48h.

Todas as extrações foram realizadas sob temperatura ambiente, no dia 25°C e injetadas no LC-UV/DAD.

4.3.4.1 Curva de Calibração do Esqualeno

O padrão de esqualeno estava em uma concentração de 800 mg L⁻¹, assim 1 mL de solução padrão foi transferida para um tubo falcon com mais 4 mL de metanol, resultando em uma concentração final de 160 mg L⁻¹. A partir desta solução pode-se fazer uma curva de calibração por partes, como mostra a tabela 2 a seguir.

Cálculo concentração da solução inicial para a preparação da curva:

$$\frac{1 \text{ mL padrão } 800 \text{ mg L}^{-1}}{5 \text{ mL total}} = 160 \text{ mg L}^{-1}$$

Tabela 1. Curva de Calibração por partes de Esqualeno

| Partes de Solução 160 mg L ⁻¹ (cada parte equivale a 100 µL) | Partes de metanol (cada parte equivale a 100 µL) | Concentração final (mg L ⁻¹) |
|--|---|---|
| 1 | 4 | 32 |
| 2 | 3 | 64 |
| 3 | 2 | 96 |

| | | |
|---|---|-----|
| 4 | 1 | 128 |
| 5 | 0 | 160 |

Fonte: Autora

Dois outros pontos foram feitos a partir da diluição do primeiro ponto, onde pegou-se 100 µL do primeiro ponto e adicionou-se 100 µL de metanol, resultando em uma concentração de 16 mg L⁻¹. O outro ponto foi feito a partir do ponto de 16 mg L⁻¹, onde pegou-se 100 µL e adicionou-se mais 100 µL de metanol, resultando em uma concentração final de 8 mg/L.

4.3.4.2 Curva de Calibração dos Parabenos

Para a curva de calibração dos parabenos utilizou-se 50 µL de cada parabeno (metil, etil, propil, butil) preparados em uma concentração inicial de 1000 mg L⁻¹, esses 50 µL de cada parabeno foram adicionados em um balão volumétrico de 10 mL e completado com metanol até o menisco, resultando em uma concentração final para cada parabeno de 5 mg L⁻¹. A curva de calibração foi feita por partes seguindo a tabela 1.

Cálculo para os pontos da curva de calibração:

$$\frac{50 \mu L \text{ metil parabeno } 1000 \text{ mg L}^{-1}}{10 \text{ mL}} = \frac{0,05 \text{ L. mg L}^{-1}}{10 \times 10^{-3} \text{ L}} = 5 \text{ mg L}^{-1}$$

$$\frac{5 \text{ mg L}^{-1} \times 1 \text{ parte (padrão)}}{10 \text{ partes totais}} = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$$

Tabela 2. Curva de Calibração por partes de Parabenos

| Partes de Solução 5 mg/L (cada parte equivale a 100 µL) | Partes de metanol (cada parte equivale a 100 µL) | Concentração final (mg/L) |
|---|--|------------------------------|
| 1 | 9 | 0,5 |
| 2 | 8 | 1 |
| 3 | 7 | 1,5 |
| 4 | 6 | 2 |
| 5 | 5 | 2,5 |
| 6 | 4 | 3 |
| 7 | 3 | 3,5 |
| 8 | 2 | 4 |

Fonte: Autora

Mais dois pontos foram obtidos a partir do primeiro ponto de 0,5 mg L⁻¹, onde em um novo eppendorf adicionou-se 100 µL de metanol e 100 µL de solução a 0,5 mg L⁻¹, resultando em um ponto de 0,25 mg L⁻¹. A partir do ponto de 0,25 mg L⁻¹ outro foi feito, onde pegou-se 100 µL de metanol e 100 µL de solução a 0,25 mg L⁻¹, resultando em um ponto de 0,125 mg L⁻¹. As alíquotas foram injetados no HPLC e determinados por espectrometria de massas e arranjo de diodos.

4.3.4.3 Preparação das amostras para análises

Preparou-se uma amostra de cabelo loiro, na qual foi cortada em pequenos pedaços, e colocou-se 100 mg em dois eppendorfs diferentes. Um foi deixado no ultrassom em aquecimento e o outro na agitação, por duas horas. As

amostras foram inseridas em um vial e analisadas no HPLC, sendo as mesmas detectadas no arranjo de diodos para a determinação de esqualeno e parabenos e espectrometria de massas para os parabenos.

4.4 Segurança no Laboratório e Tratamento de Resíduos

O procedimento experimental abordado nesse trabalho não traz muitos riscos de laboratórios, no entanto, alguns cuidados devem ser tomados. O uso de jalecos é imprescindível para qualquer procedimento realizados em laboratório, seja ele de alta periculosidade ou não. Essa vestimenta, além de proteção evita possíveis fontes de contaminação provenientes das roupas.

O uso de luva também é extremamente necessário nesse experimento, primeiramente como segurança na manipulação de metanol e etanol. Mas, é muito importante para não contaminar as amostras, como as amostras foram analisadas sem lavagem prévia, a mão é uma grande fonte de contaminação no momento em que as mechas de cabelos são cortadas.

O LC/MS ou LC/DAD é um equipamento que não exige grande volumes de amostras para as análises, assim os resíduos gerados são poucos. No entanto alguns resíduos são gerados no momento de preparação de amostras (aproximadamente 500 μ L de volume cada amostra) e principalmente na preparação das curvas de calibração, aproximadamente 10 mL cada curva de calibração.

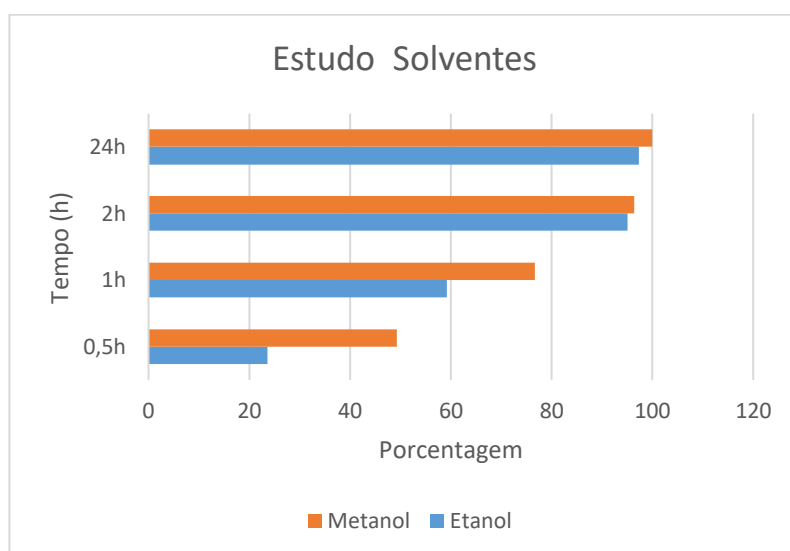
Os resíduos gerados foram encaminhados para a empresa responsável pelo tratamento de resíduos da UFSC.

5 Resultados e Discussões

5.1 Testes para determinação do preparo de amostras

Partiu-se de alguns estudos que trazem o metanol e o etanol como os principais solventes para a extração em cabelos. Assim, fez-se um teste para identificar o melhor tempo para a extração dos compostos em cabelos (parabenos e esqualeno), como descrito na metodologia, obteve-se então os seguintes resultados. Sendo o parâmetro de porcentagem analisado em relação à área (maior área equivale a 100%) do pico obtido para esqualeno e parabenos.

Figura 8. Estudo da eficiência da extração de parabenos e esqualeno em cabelos, utilizando metanol e etanol.



Fonte: Autora

Para tal, com intuito de uma análise mais rápida e eficiente escolheu-se o metanol como solvente para a extração dos compostos do cabelo. Assim, o preparo de amostra foi realizado com o metanol, assim também como foi utilizado para a preparação das curvas de calibração. O tempo de extração escolhido foi de 2 horas de extração, pois o mesmo é muito próximo a quantidade extraída em 24 horas, assim com intuito de uma preparação mais rápida, foi escolhido o tempo de 2 horas para a preparação da amostra.

5.2 Determinação de compostos endógenos

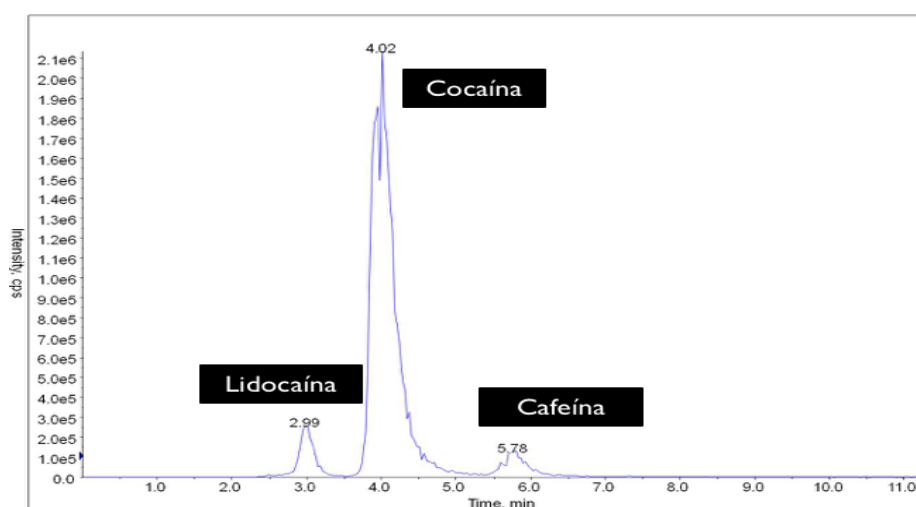
5.2.1 Determinação de cocaína em cédulas monetárias

Como prova de conceito performance do método cromatográfico para a análise de substâncias toxicológicas, utilizou-se a cédula monetária, para a detecção de cocaína. Primeiramente para análise na espectrometria de massas, deve-se escolher o modo de ionização (positivo ou negativo), sendo o positivo escolhido, isso porque compostos que apresentam caráter básico apresentam um sinal mais intenso quando analisados nesse modo.

A intensidade do sinal dos íons percursores foi obtida através do monitoramento dos espectros de massas, no qual foi adquirido no modo escaneamento Q1 MS. No método em que a amostra foi analisada, encontra-se diversas drogas, com suas energias de colisão, valores de Q1 (filtro de massa do íon precursor) e Q3 (filtro de massa do íon final), como pode-se observar no anexo C, página III, ou seja o método é eficiente para a detecção de diversos analitos, nessa amostra foram detectados apenas três.

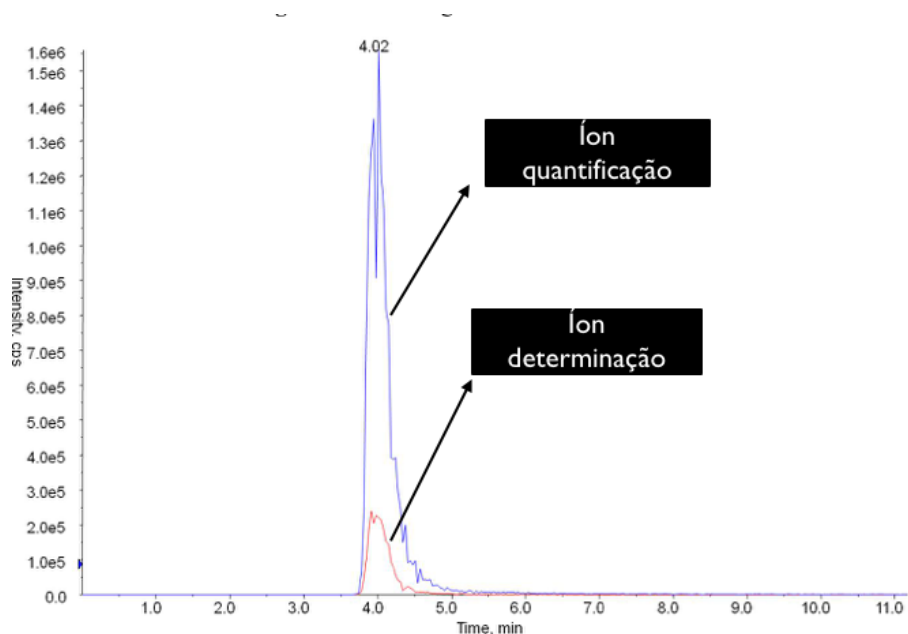
Após a análise obtém-se então o cromatograma da Figura 9 onde pode-se perceber três picos mais intensos, sendo eles lidocaína (a lidocaína é encontrada na nota, pois é um composto utilizado como adulterante da cocaína), cocaína e cafeína, respectivamente. No segundo cromatograma, Figura 10, apresenta-se apenas a cocaína, sendo monitoradas apenas as transições de íon-precursor/íon-fragmento, o sinal em azul, apresenta o fragmento mais intenso 304/182 (íon produto de quantificação), e o sinal em vermelho sinal do outro íon-fragmento, menos intenso 304/105 (íon produto de detecção), o qual pode ser comprovado na Figura 10, onde apresenta-se o espectro de massas da cocaína, com seus respectivos fragmentos, destacados.

Figura 9. Cromatograma da análise de substâncias na cédula monetária



Fonte: Autora

Figura 10. Cromatograma das transições iônicas cocaína



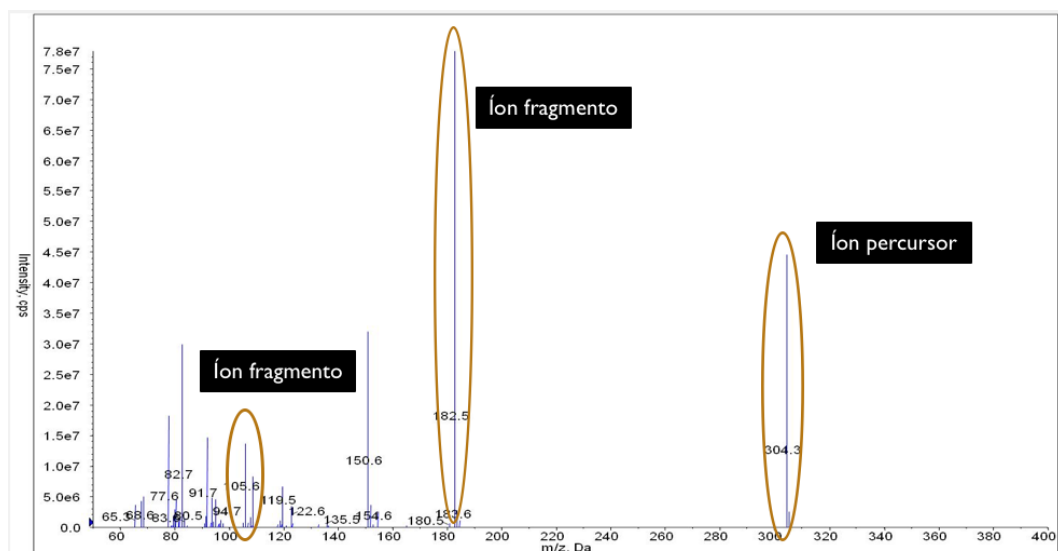
Fonte: Autora

Para a comprovação do analito, utilizou-se alguns parâmetros, como o tempo de retenção do analito, as energias de transição do íon-precursor e do íon-fragmento e a massa molar. Na Figura 10 pode-se observar a confirmação do analito, em relação a carga massa dos fragmentos, sendo os destacados os mais comuns e característicos da cocaína. A partir dos dados obtidos na Figura 9, pode-se obter os dados da Figura 10, a partir do modo IDA. O IDA, como

comentado anteriormente é um método que permite o acoplamento de mais de um modo de varredura de massas, simultâneo ao cromatograma obtido, ou seja, a partir do cromatograma da Figura 9, é possível ao pressionar sobre o pico da cocaína, obter as informações de espectrômetro de massas, obtidos na Figura 10. E assim pode-se obter informações dos diversos íons identificados nos cromatogramas.

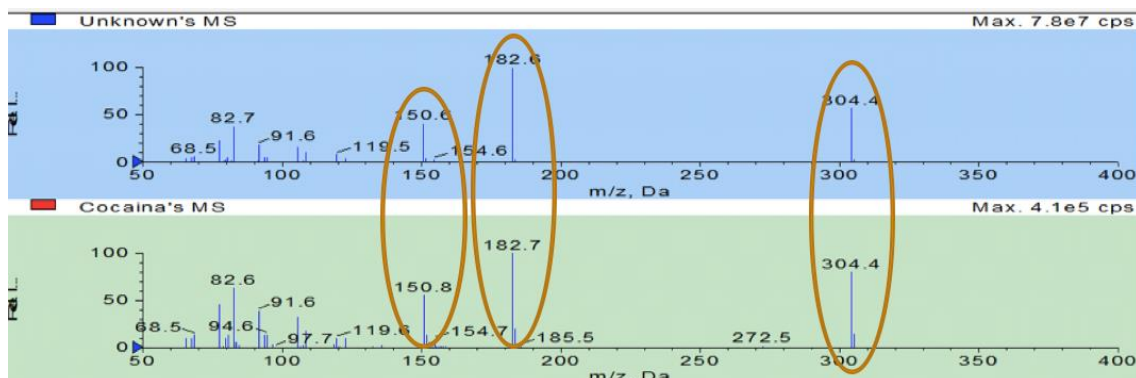
Na Figura 11, apresenta-se a comparação do espectro obtido com o presente na biblioteca, comprovando mais uma vez a presença da cocaína. Com isso o método mostrou-se eficiente, e pôde-se ser capaz de identificar a cocaína na amostra da cédula monetária, mostrando que o método é eficaz e que também pode ser utilizado para outros tipos de amostras, para identificar diversos fármacos, drogas e seus metabólitos.

Figura 11. Espectro de massas da cocaína na amostra de dinheiro.



Fonte: Autora

Figura 12. Comparação do espectro da amostra e o espectro presente na biblioteca.

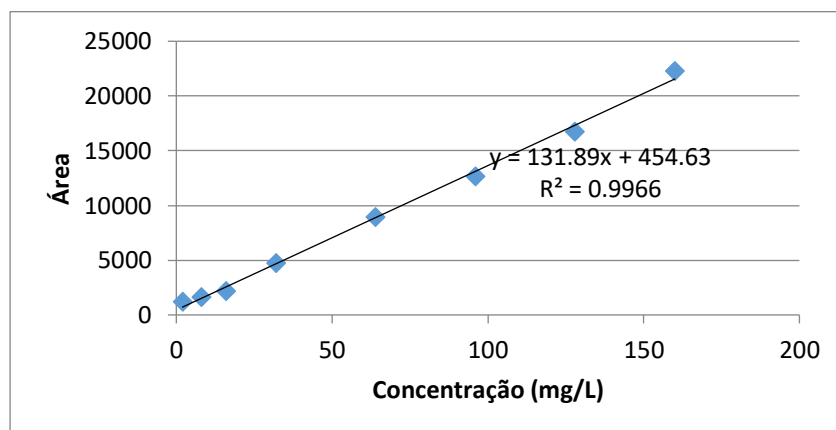


Fonte: Autora

5.2.2 Determinação de esqualeno em cabelo

O esqualeno, sendo uma molécula composta apenas de carbono e hidrogênio, não sofre ionização e, portanto, não pode ser detectada na espectrometria de massas, assim a comparação de detectores realizada com os parabenos não pode ser possível para o esqualeno, o método efetuado foi o mesmo aplicado para a análise de parabenos por DAD. Na Figura 20 encontra-se a curva de calibração para a determinação do esqualeno.

Figura 13. Curva de Calibração para Esqualeno

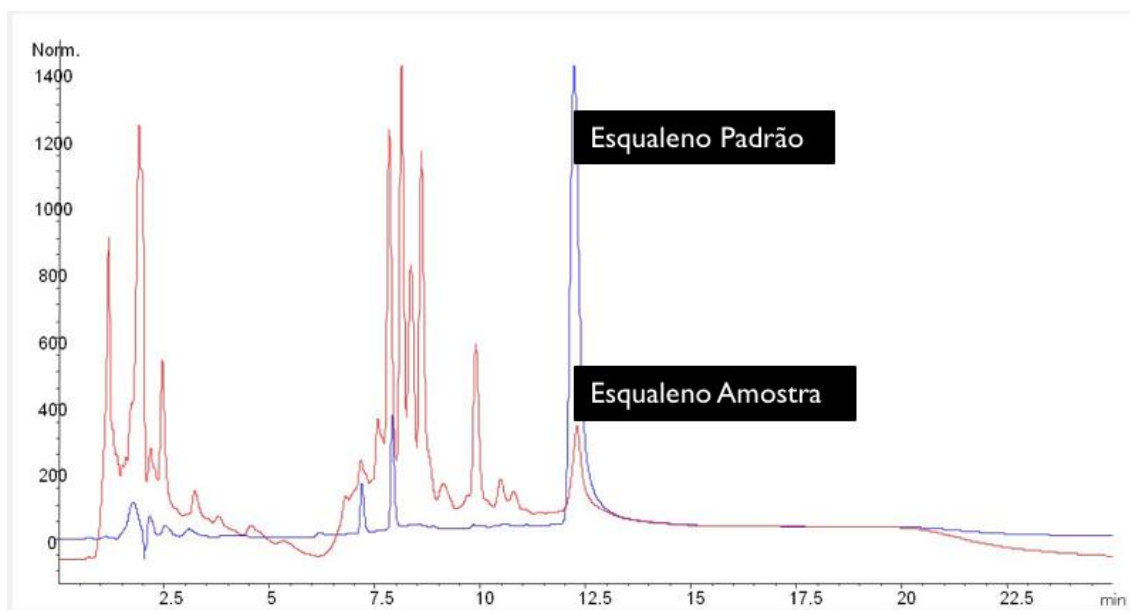


Fonte: Autora

Nos cromatogramas a seguir trás no primeiro, Figura 19, o pico referente ao esqualeno encontrado na amostra. Está apresentado em vermelho o pico do

esqualeno encontrado na amostra e o pico em azul é a referência do padrão, comprovando que tanto o padrão de esqualeno, quanto o pico encontrado na amostra obtiveram o mesmo tempo de retenção.

Figura 14. Cromatograma da análise de esqualeno na amostra



Fonte: Autora

Para determinação da concentração de esqualeno, a partir da curva de calibração descrita previamente, obteve-se uma concentração final de esqualeno na amostra de cabelo, de 11,74 mg/L. Observou-se também que o esqualeno demora mais para ser eluído, perto de 13 minutos, o método de detecção é o mesmo do utilizado para os parabenos, então, o esqualeno tem uma maior interação com a coluna inicialmente, e perto dos 13 minutos ele é eluído.

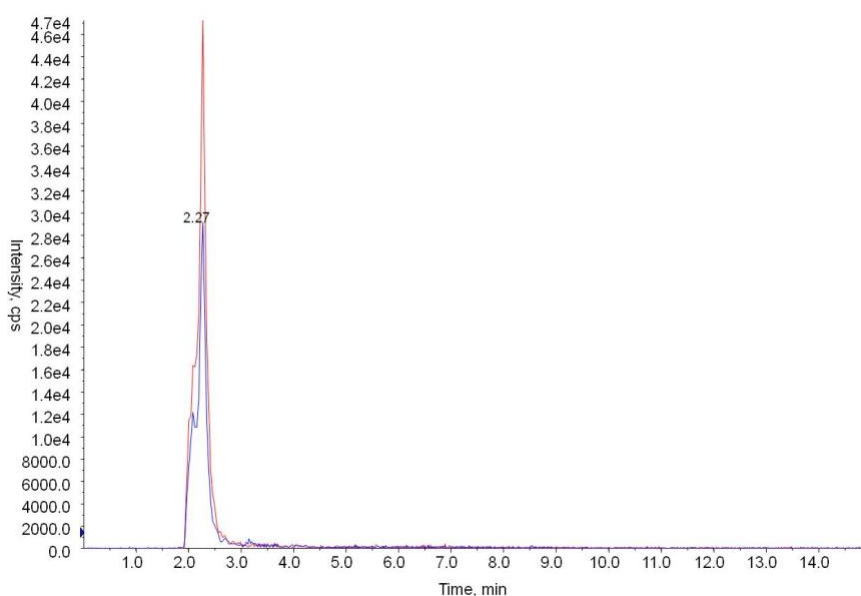
Assim, a técnica se mostrou eficiente para a detecção endógena de analitos, presentes no cabelo, mostrando ao fim, que o método de extração e detecção estudadas nesse trabalho, são eficientes para a detecção de compostos presentes no cabelo, sejam eles metabólitos ou compostos ingeridos.

5.3 Determinação de Compostos Exógenos

5.3.1 Determinação de Nicotina

Também para comprovação do método para determinação de substâncias toxicológicas descrito previamente, fez-se uma análise com uma amostra contaminada de maneira exógena com nicotina. Após a injeção da amostra no equipamento obteve-se o cromatograma da Figura 12. No primeiro pode-se observar apenas um pico mais intenso e relevante, no segundo mostra as transições do íon-percursor e do íon-fragmento sendo esses 163/132, comprovando que têm as mesmas energias de transições do padrão (anexo C, página III), assim também como o mesmo tempo de retenção.

Figura 15. Cromatograma da análise de nicotina contaminada de maneira exógena



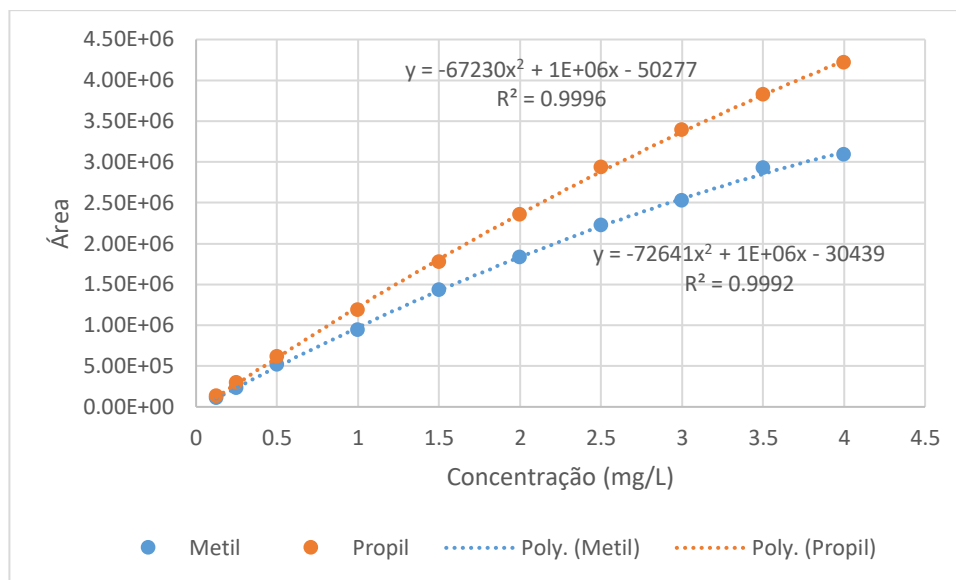
Fonte: Autora

5.3.2 Determinação de Parabenos

Como fonte de contaminação exógena determinou-se parabenos em cabelo, para tal, construiu-se uma curva de calibração para posterior quantificação de parabenos nas amostras. Obteve-se as seguintes curvas de calibração para o metil, etil, propil e butil parabenos. Como apenas o metil e o

propil puderam ser identificados nas amostras, as curvas do etil e butil parabeno estão apresentadas nos apêndices 1 e 2, página V.

Figura 16. Curva de calibração Metilparabeno e Propilparabeno com detecção por espectrometria de massas



Fonte: Autora

5.3.2.1 Quantificação de parabenos na amostra por espectrometria de massas

Com os parâmetros da curva de calibração pôde-se determinar os valores do limite de detecção e quantificação para cada curva. Foi escolhido o modelo quadrático para a quantificação, porque na análise das curvas de calibração, notou-se uma tendência quadrática e, assim, obteve-se também um melhor valor de coeficiente de determinação de regressão.

Para a obtenção dos limites de quantificação e detecção, os resultados foram calculados a partir do sinal ruído obtido para cada ponto da curva em relação a sua concentração, após faz-se uma média aritmética entre os resultados e é multiplicado por 3,3 para o limite de detecção e 10 para o de quantificação³⁸.

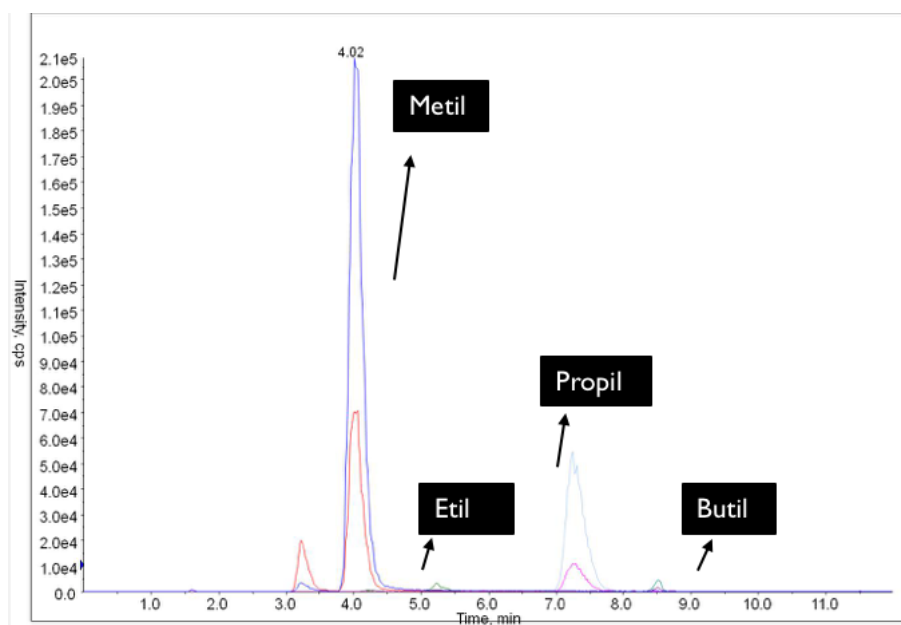
Tabela 3. Limite de quantificação e detecção dos parabenos com detecção por espectrometria de massas.

| | Metil ($\mu\text{g/L}$) | Etil ($\mu\text{g/L}$) | Propil ($\mu\text{g/L}$) | Butil ($\mu\text{g/L}$) |
|----|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| LD | 1,36 | 1,04 | 1,76 | 0,48 |
| LQ | 4,13 | 3,15 | 5,35 | 1,46 |

Fonte: Autora

No cromatograma a seguir, é possível perceber os quatro parabenos, mas alguns em uma quantidade ínfima e que não podem ser quantificados, estão abaixo do limite de quantificação do método proposto. A ordem de eluição se dá devido ao fato da coluna ser mais apolar (fase estacionária) e a fase móvel ser mais polar, assim o metilparabeno, por exemplo, tem mais interação com a fase móvel, sendo eluído primeiro, seguido do etil, propil e butilparabeno.

Figura 17. Cromatograma da análise de parabenos em cabelo por espectrometria de massas



Fonte: Autora

A amostra foi extraída de duas maneiras diferentes, uma com metanol em ultrassom, por 2h e a outra também com metanol no agitador e também permaneceu por 2h.

Tabela 4. Quantificação de parabenos presente na amostra

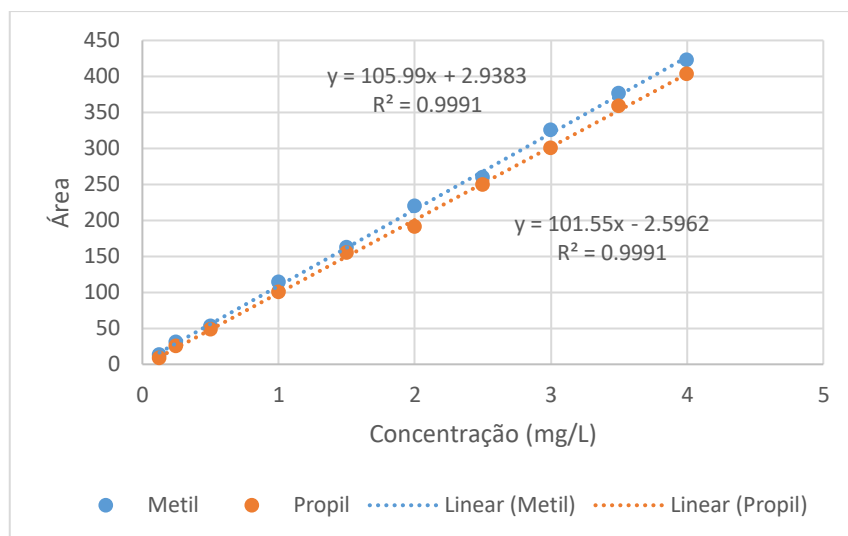
| | Concentração amostra agitador (ppm) | Concentração amostra ultrassom (ppm) |
|--------|--|---|
| Metil | 2,52 | 3,08 |
| Etil | < LQ | < LQ |
| Propil | 0,55 | 0,82 |
| Butil | < LQ | < LQ |

Fonte: Autora. *LD – Limite de Detecção, *LQ – Limite de Quantificação.

5.3.2.2 Quantificação de Parabenos por DAD

A mesma curva de calibração feita para a determinação de parabenos por espectrometria de massas, foi também realizada por detecção UV, com o intuito de realizar uma comparação entre os dois métodos, através dos seus limites de quantificação e detecção. As curvas foram feitas para o metil, etil, propil e butil parabenos, as curvas do butil e etil serão apresentadas nos apêndices 3 e 4, página VI, e as do metil e propil estão apresentadas nas figuras 16 e 17 respectivamente.

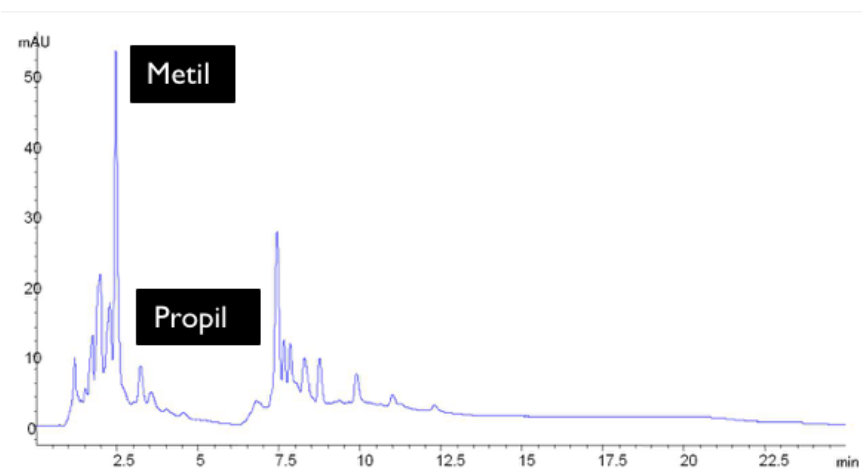
Figura 18. Curva de Calibração Metilparabeno e Propilparabeno com análise por DAD



Fonte: Autora

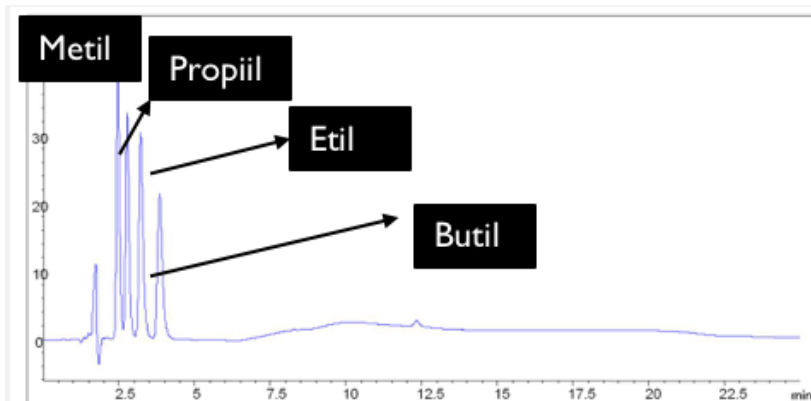
No primeiro cromatograma percebe-se apenas dois picos referentes ao metil e o propil parabeno. No segundo o cromatograma do padrão de parabenos, mostrando que o tempo de retenção é o mesmo para o metil e propilparabeno, os quais puderam ser detectados e quantificados. O tempo de retenção dos parabenos é menor, uma análise de 8 minutos teria eluído todos os analitos. Isso se deve ao fato dos mesmos terem uma maior interação com os solventes e uma menor interação com a coluna, já que a coluna é uma coluna apolar e os solventes são mais polares.

Figura 19. Cromatograma da análise da amostra de parabenos por detecção de arranjo de diodos.



Fonte: Autora

Figura 20. Cromatograma do padrão de parabenos



Fonte: Autora

Para a determinação das amostras utilizou-se alíquotas extraídas da mesma maneira que as amostras analisadas pela espectrometria de massas.

Tabela 5. Dados relativos à concentração de parabenos na amostra com detecção DAD.

| | Concentração amostra agitador (mg/L) | Concentração amostra ultrassom (mg/L) |
|--------|---|--|
| Metil | 1,77 | 2,67 |
| Etil | < LD | < LD |
| Propil | 0,22 | 0,44 |
| Butil | < LD | < LD |

Fonte: Autora

Com os parâmetros da curva de calibração dos parabenos com detecção por arranjo de diodos, pôde-se fazer um comparativo entre os dois métodos utilizados. Na tabela 5 apresenta-se os limites de detecção e quantificação das curvas do metil, etil, propil e butil parabenos detectados por arranjo de diodos.

Tabela 6. Limite de detecção e quantificação dos parabenos detectados por DAD

| | Metil (µg/L) | Etil (µg/L) | Propil (µg/L) | Butil (µg/L) |
|----|--------------|-------------|---------------|--------------|
| LD | 14,39 | 16,60 | 22,60 | 32,30 |
| LQ | 45,42 | 20,70 | 68,60 | 97,80 |

Fonte: Autora

Assim, percebeu-se que para os parabenos, pôde-se obter um melhor limite de quantificação e detecção na detecção por espectrometria de massas, um resultado previsto, já que se sabe previamente que é uma técnica com maior detectibilidade. O mesmo pode ser comprovado na quantificação e detecção das amostras, descritas posteriormente. Mas sendo o DAD uma técnica mais acessível, e financeiramente mais viável, pode-se utilizar a mesma para a

determinação de parabenos, já que essa apresenta uma boa detectibilidade para esses compostos.

5.5.2 Comparação das técnicas de detecção LC/MS e UV-DAD para a determinação de parabenos.

Tabela 7. Comparação dos valores de LQ e LD obtidos a partir das curvas de calibração dos parabenos.

| | Metil ($\mu\text{g/L}$) | Etil ($\mu\text{g/L}$) | Propil ($\mu\text{g/L}$) | Butil ($\mu\text{g/L}$) |
|------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| LD (LC/MS) | 1,36 | 1,04 | 1,76 | 0,48 |
| LQ (LC/MS) | 4,13 | 3,15 | 5,35 | 1,46 |
| LD (DAD) | 14,39 | 16,60 | 22,60 | 32,30 |
| LQ (DAD) | 45,42 | 20,70 | 68,60 | 97,80 |

Fonte: Autora

A partir dos resultados obtidos das curvas de calibração dos parabenos, pôde-se perceber que a técnica de espectrometria de massas, apresenta uma maior detectibilidade. Pode-se perceber a partir da Tabela 6, que o limite de detecção do metilparabeno obtida na espectrometria de massas é de 1,36 $\mu\text{g/L}$ já por detecção de arranjo de diodos foi de 14,39; ou seja, um limite de detecção 10 vezes maior do que o obtido na espectrometria de massas, mostrando uma maior eficiência na obtenção de dados por LC/MS. Já se tratando de limite de quantificação, o obtido na espectrometria de massas também é 10 vezes menor do que o obtido por arranjo de diodos.

Como pôde ser observado nas curvas de calibração, efetuadas em dois detectores diferentes, os limites de detecção e quantificação foram melhores obtidos na detecção por espectrometria de massas. Nas amostras o mesmo pôde ser observado, já que nos resultados obtidos por espectrometria de massas, as concentrações foram maiores para o metilparabeno e o propil, e no

etil e butilparabeno detectados por LC/MS as amostras não puderam ser quantificadas, porém foram detectadas, fato não obtido nos resultados por arranjo de diodos, já que os resultados para o etil e butilparabeno foram menores que os limites de detecção.

O mesmo pode ser observado nas análises dos cromatogramas, das Figuras 15 e 19. Na Figura 15 pôde ser observado os picos referentes aos quatro parabenos, mesmo os picos do etil e butilparabenos sendo bem pequenos. Já na Figura 19 é possível observar apenas os picos do metil e propilparabenos, que estão destacados na figura.

6 Conclusão

A partir do trabalho pôde-se esquematizar um método para a determinação de drogas em cabelo. O método cromatográfico proposto se mostrou eficiente e viável para a determinação de cocaína, sendo que o mesmo pode ser aplicado em diversos outros tipos de entorpecentes e seus metabólitos, além de poder ser usado em qualquer tipo de amostras.

Com os preparos de amostras propostos, teve um resultado muito significativo, mostrando que pode ser utilizado para a extração de compostos tanto endógenos como exógenos em cabelos.

A análise se parabenos e nicotina, se deu para mostrar que o cabelo é uma amostra o qual é muito suscetível a contaminação. Sendo um parabenos, um analito que não necessita de uma análise comprobatória tão efetiva, como a cocaína, o mesmo pôde ser detectado por arranjo de diodos, tendo então uma alternativa para a análise desse analito. Mesmo a espectrometria de massas apresentando melhores resultados, a análise por arranjo de diodos se mostrou viável, o qual pode ser utilizada, já que é uma técnica mais barata.

Sendo o esqualeno um composto endógeno, com o mesmo pôde mostrar que é possível detectar um composto proveniente do interior do fio, como é o caso das drogas que são ingeridas e levadas pelos vasos sanguíneos até o fio.

Assim, os métodos propostos são eficientes para a análise de drogas em cabelo, e puderam mostrar bons resultados frente as análises feitas.

7 Referências

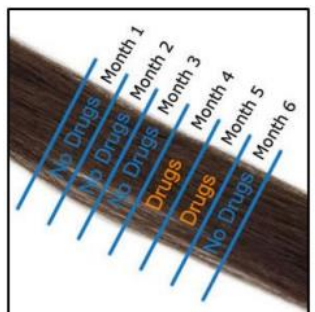
1. UFSJ. **Composição e estrutura dos cabelos**. Disponível em: <<http://www.campusvirtual.ufsj.edu.br/mooc/ciencianacomunidade/composicao-e-estrutura-dos-cabelos/>>. Acesso em: 14 out. 2018.
2. LISBÔA, C. P.. **Estudo Comparativo da Sorção de Lipídeos em Cabelos Caucasiano e Negroíde**. 2007. 66 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Unicamp, Campinas, 2007.
3. ABRAHAM, L. S. et al. Tratamentos estéticos e cuidados dos cabelos: uma visão médica (parte 1). **Surgical & Cosmetic Dermatology**. Rio de Janeiro, p. 130-136. set. 2009.
4. GAMA, R. M. da. **Avaliação do dano a haste capilar ocasionado por tintura oxidativa aditivada ou não de substâncias condicionadoras**. 2010. 181 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Usp, São Paulo, 2010.
5. MERZ (Org.). **Estrutura do cabelo saudável**. Disponível em: <http://www.pantogar.com/pt/allabouthair/structure_of_healthy_hair/index.jsp>. Acesso em: 20 jan. 2018.
6. BOST, Robert. O.. Hair analysis perspectives and limits of a proposed forensic method of proof: a review. **Forensic Science Internaional**. Amsterdam, p. 31-42. 1993.
7. PEREIRA, S. N.. **Entenda o ciclo de crescimento do cabelo**. Disponível em: <<http://cabeloafro.com.br/ciclo-de-crescimento-do-cabelo/>>. Acesso em: 20 jan. 2018.
8. YANG, F.; ZHANG, Y.; DTER, M. C.. Rheinsta. The structure of peoples's hair. **Peerj**. Ontario, p. 1-19. out. 2014.
9. PEREIRA, J. M.. Propedêutica dos cabelos e do couro cabeludo. **Ed. Atheneu**. São Paulo. 2001.
10. HENDERSON, G.I. et al. Incorporation of Isotopically labeled cocaine into humans hair: race as a factor. **Analyst Toxicology**. Niles, p. 156-165. 1998.
11. SACHS, H.. History of hair analysis. **Elsevier**. Munique, p. 7-16. jan. 1997
12. CHATT, A.; KATZ, S. A.. **Hair analysis: Applications in the biomedical and environmental sciences**. Nova Iorque: VchPublishers, 1989. 144 p.
13. POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIUS, A. J.. Análise de cabelo: Uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. **Química Nova**. Florianópolis, p. 838-846. fev. 1999.
14. MUSSHOF, F.; ROSENDAHL, W.; MADEA, B.. Determination of nicotine in hair samples of pre-Columbian mummies. **Forensic Science Internaional**. Mannheim, p. 84-88. jul. 2008.
15. LOZANO-GRANDE, M. A. et al. Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene. **International Journal Of Agronomy**. Morelos, p. 1-12. ago. 2018.
16. POPA, O. et al. Methods for Obtaining and Determination of Squalene from Natural Sources. **Biomed Research International**. Bucharest, p. 1-16. jan. 2015.

17. AUWÄRTER, V.; KIEßLING, B.; PRAGST, F.. Squalene in hair - a natural reference substance for the improved interpretation of fatty acid ethyl ester concentrations with respect to alcohol misuse. **Forensic Science International**. Berlin, p. 149-159. jun. 2004.
18. PRAGST, F.; BALIKOVA, M. A.. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. **Clinica Chimica Acta**,. Prague, p. 17-49. fev. 2006.
19. TORRES, B. B. et al. **Bioquímica da Beleza**. Disponível em: <<http://www.iq.usp.br/bayardo/bioqbeleza/bioqbeleza.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2018.
20. NAKAHARA, Y.; TAKAHASHI, K.; IKURA, R.. Hair analysis for drugs of abuses, x: effect of physicalchemical properties of drugs on the incorporation rates into hair. **Biology AndPharmacetical Bulletin**. Tokyo, p. 157-167. 2000.
21. REID, W. R. et al. Cocaine and metabolites in human hair: pigmentary relationship. **J. Toxicology Clin. Toxicology**. Monticello, p. 685-690. 2000.
22. BERTOL, E. et al. Determination of GHB in human hair by HPLC-MS/MS: Development and validation of a method and application to a study group and three possible single exposure cases. **Drug Testing And Analysis**. Florença, p. 1-9. 2014.
23. HUTTER, M. Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal OfCromathography**. Breisgau, p. 95-101. abr. 2012.
24. CORCIA, D. di et al. Simultaneous determination in hair of multiclass drugs of abuse (including THC) by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Cromathography**. Torino, p. 154-159. 2012.
25. CANEIRO, M. T. W. D.. Determinação de metais pesados em cabelo como indicador do nível de poluição do município de Vitória (ES). In: SBQ, 31., 2008, Espírito Santo. **Resumo...**. Espírito Santo: Sbq, 2008. p. 1 - 2.
26. DE SOUZA, V.M.; JUNIOR, D.A. A questão da Toxicidade nos cosméticos e o aumento no consumo de cosméticos infantis. **Ativos Dermatológicos – Dermocosméticos e Nutracêuticos. Pharmabooks** – São Paulo, 2013.
27. GOMES, A. B. Alergia a cosméticos. **Ativos Dermatológicos**, vol. 8. São Paulo, 2013.
28. M.G.SONIA et al. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. **Food And Chemical Toxicology**. Vero Beach, p. 890-893. set. 2000.
29. FERNANDES, J. P. S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A. C. G.. Estudo das Relações Entre Estrutura e Atividade de Parabenos: Uma Aula Prática. **Química Nova**. São Paulo, p. 890-893. mar. 2013
30. HOPPE, A. C.; PAIS, M. C. N.. Avaliação da toxicidade de parabenos em cosméticos. **Revinter**. São Paulo, p. 49-70. out. 2017.

31. CASSAROTTI, A. L. de S.; LUBI, N. C.. **Malefícios decorrentes do uso de produtos contendo parabenos**. Disponível em: <<http://tcconline.utp.br/media/tcc/2017/05/MALEFICIOS-DECORRENTES-AO-USO-DE-PRODUTOS-CONTENDO-PARABENOS.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2018.
32. CLINE, A. et al. No Sulfates, No Parabens, and the “No-Poo” Method: A New Patient Perspective on Common Shampoo Ingredients. **Skin of Color**. North Carolina, p.22-26. 2018.
33. COLLINS, Carol H; BRAGA, Gilberto L; BONATO, Pierina S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Campina Sp: Editora da Unicamp, 1997. p. 185-237.
34. MDS SCIEX. **Information Dependent Acquisition - The next Generation of Data Dependent Experiments for LC/MS/MS Analysis**. Foster City: Mds Sciex, 2001.
35. DECAESTECKER, T. N. et al. Information Dependent Acquisition - Mediated LC-MS/MS Screening Procedure with Semiquantitative Potential. **Analytical Chemistry**. Brussels, p. 6365-6373. set. 2004.
36. MULLER, C. A. et al. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a Strap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library teaching. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**. Freiburg, p. 1332-1338. mar. 2005.
37. ARGENTON, Ayrton. **Conceitos fundamentais de Cromatografia a líquido de Alto Desempenho (HPLC)**. Disponível em: <https://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos_hplc_2010.pdf>. Acesso em: 10 out. 2018.
38. RIBANI, M.. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**. Curitiba, p. 771-780. jun. 2004.

I Anexos

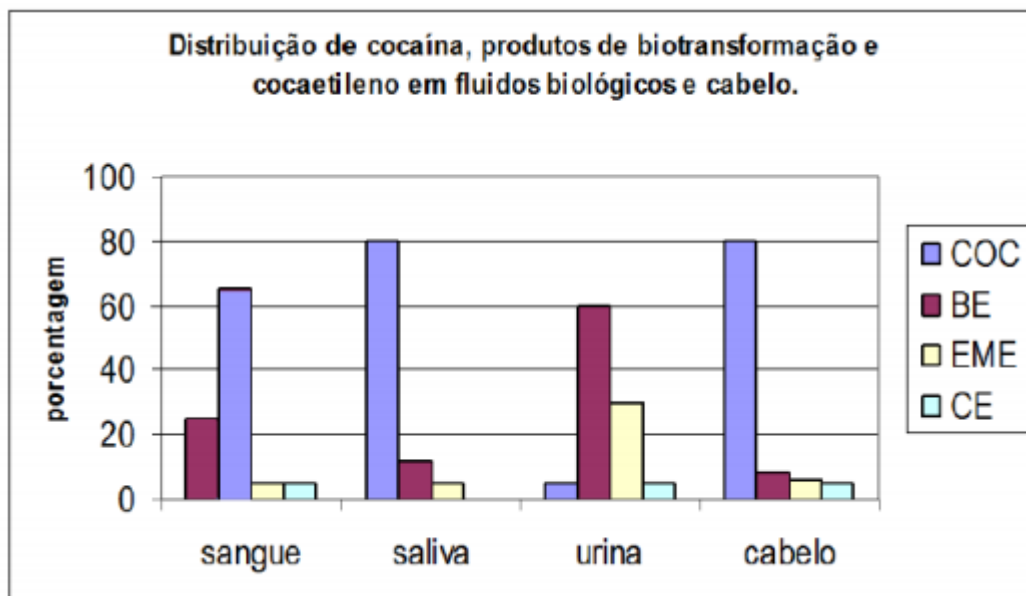
Anexo A - Parâmetro de análise para o histórico de uso de drogas, sendo o mais utilizado a cocaína.



Cada 1 cm indica 1 mês anterior de uso de substância.

Fonte 1: BARBOSA, Lilian. Toxicologia Forense. Campinas: Lilian Barbosa, 2017.

Anexo B - Porcentagem de Cocaetileno, Benzoilecgonina, Ecgoninametilester e Cocaína que podem ser encontradas em diferentes tipos de amostragem.



Fonte 2: SPIEHLER, V.. Conference on Drug Testing in Hair. Tampa, FL: Society Of Forensic Toxicology, 1994.

Anexo C: Tabela Transições MRM e Energia de Colisão

| Name | Q1* | Q3* | CE* | Name | Q1* | Q3* | CE* |
|------------------------|-------|-------|-----|----------------------------|-------|-------|-----|
| 6-O-monoacetylmorphine | 328 | 165.0 | 50 | malathion | 331.2 | 127 | 20 |
| acebutolol | 337.0 | 319.0 | 20 | mda ^b | 163.1 | 133.2 | 20 |
| aceprometazine | 327.1 | 239.8 | 35 | mdc ^c | 208.2 | 163.2 | 20 |
| acrivastine | 349.2 | 278.0 | 20 | mdma ^d | 194.2 | 163.0 | 20 |
| ajmaline | 327.2 | 158.2 | 50 | meclizine | 391.2 | 201 | 20 |
| alprazolam | 309.0 | 281.0 | 35 | medazepam | 271.1 | 91 | 35 |
| alprenolol | 250.2 | 173.0 | 20 | meloxicam | 352 | 115 | 35 |
| amantadine | 152.2 | 135.3 | 20 | melperone | 264 | 165 | 35 |
| amiloride | 230.2 | 171 | 20 | mepindolol | 263.2 | 116.1 | 20 |
| aminophenazone | 232.2 | 113 | 20 | meprobamate | 241.2 | 139 | 20 |
| aminopromazine | 328.1 | 238.1 | 20 | mescaline | 195.1 | 165.1 | 35 |
| amiodarone | 646 | 100.0 | 35 | mesoridazine | 387.2 | 372.3 | 35 |
| amitriptyline | 278.0 | 233.0 | 20 | metaclozepam | 395 | 241.2 | 50 |
| amlodipine | 409 | 238.1 | 20 | metamphetamine | 150.2 | 91.0 | 20 |
| amphetamine | 136 | 119.0 | 20 | metformin | 130.1 | 60.1 | 20 |
| apomorphine | 268.1 | 237.1 | 20 | methadone | 310 | 265.0 | 20 |
| aprimidine | 323.2 | 114.1 | 20 | methadone, nor- | 296.2 | 251 | 20 |
| astemizole | 459.2 | 218.0 | 35 | methylphenidate | 234.2 | 84.1 | 35 |
| atenolol | 267.2 | 225.0 | 20 | methylscopolamine | 318.2 | 152.1 | 35 |
| atropine | 290.1 | 124.1 | 35 | metipranolol | 310.2 | 191.2 | 35 |
| befunolol | 292.1 | 177 | 35 | metoclopramide | 300.2 | 227.0 | 20 |
| benazepril | 424.9 | 351.1 | 35 | metoprolol | 268.2 | 191.0 | 20 |
| benzatropine | 308.2 | 167.1 | 35 | metronidazole | 172.2 | 128 | 20 |
| benzocaine | 166.2 | 138.1 | 20 | mexiletine | 180.2 | 58 | 20 |
| benzocetamine | 250.1 | 191.1 | 20 | mianserin | 265.2 | 208.0 | 20 |
| benzoylcegonine | 290.2 | 168.0 | 20 | miconazole | 416.9 | 159.1 | 35 |
| betaxolol | 308.2 | 116.3 | 35 | midazolam | 326 | 291 | 35 |
| biperiden | 312.2 | 98 | 35 | mirtazapine | 266.2 | 195.0 | 35 |
| bisoprolol | 326.2 | 116.0 | 20 | mizolastine | 433.2 | 308.4 | 20 |
| bromazepam | 316 | 182.1 | 35 | modobemide | 269 | 182 | 20 |
| brompheniramine | 319.2 | 274.2 | 20 | molindone | 277.2 | 100 | 35 |
| bromocriptine | 655.2 | 346 | 20 | molindomine | 242.8 | 86.1 | 20 |
| brotizolam | 395 | 315.2 | 35 | morphine | 286 | 201.0 | 35 |
| bunitrolol | 249.2 | 193.2 | 35 | morphine-3-β-D-glucuronide | 462 | 285.8 | 20 |
| bupivacaine | 289.2 | 140.3 | 35 | naloxone | 328.2 | 310.3 | 35 |
| bupranolol | 272.1 | 216.1 | 20 | naltrexone | 342.2 | 324.0 | 35 |
| buprenorphine | 468.2 | 396.3 | 50 | nateglinide | 318.8 | 166.2 | 20 |
| bupropione | 386.2 | 122 | 50 | nicardipine | 480 | 314.9 | 35 |
| bupropazine | 410.1 | 141.2 | 35 | nicotine | 163.2 | 132.0 | 20 |
| caffeine | 195.0 | 138.0 | 35 | nifedipine | 347.2 | 254.0 | 20 |
| candesartan | 441.0 | 263.2 | 20 | nilvadipine | 386 | 326.0 | 20 |
| captopril | 218.1 | 116.2 | 20 | nimodipine | 419.0 | 343.1 | 20 |
| carazolol | 299.2 | 116.1 | 20 | nisoldipine | 389.0 | 357.0 | 20 |
| carbamazepine | 237.0 | 194.0 | 20 | nitrazepam | 282.2 | 236 | 35 |
| carbamazole | 187.1 | 115 | 20 | nitrendipine | 361.0 | 314.8 | 20 |
| carbinoxamine | 291.2 | 202.0 | 20 | nizatidine | 332.2 | 286 | 20 |
| carbuterol | 268.1 | 194.1 | 20 | norbuprenorphine | 414.2 | 187.1 | 50 |
| carisoprodol | 261.2 | 176.0 | 20 | normorphine | 272.0 | 272.0 | 35 |
| carteolol | 293.2 | 237.1 | 20 | nortriptyline | 264.2 | 233.3 | 20 |
| carvedilol | 407.2 | 222.0 | 35 | noscapine | 414.1 | 220.1 | 35 |
| celiprolol | 380.2 | 251.0 | 35 | obidoxime | 288.3 | 135.1 | 20 |
| cetirizine | 389.2 | 201.2 | 35 | OH-THC ^e | 331.0 | 313.0 | 20 |
| chlorcyclizine | 201.0 | 166.0 | 20 | olanzapine | 313.2 | 256.0 | 35 |
| chlorthalidopexide | 300.2 | 282.0 | 35 | ondansetron | 294.2 | 170.0 | 35 |
| chloroquine | 320.0 | 247.0 | 35 | opipramol | 364.1 | 171.2 | 20 |
| chlorphenethazine | 305.0 | 72.0 | 50 | orphenadrine | 270.4 | 181.2 | 20 |
| chlorpheniramine | 275.2 | 230.2 | 20 | oxazepam | 287.0 | 269.0 | 20 |
| chlorpromazine | 319.0 | 246.0 | 35 | oxcarbazepine | 253.2 | 236.0 | 20 |
| chlorprothixene | 316.0 | 231.0 | 35 | oxitropium | 332.2 | 166.2 | 35 |
| cinnarizine | 369.2 | 167.0 | 20 | oxprenolol | 266.2 | 225.3 | 20 |
| cisapride | 466.2 | 184 | 35 | oxycodone | 316.2 | 298.3 | 20 |
| citalopram | 325.0 | 109.0 | 35 | papaverine | 340.2 | 202 | 35 |
| clemastine | 344.2 | 215.2 | 20 | paracetamol | 152.0 | 110.0 | 20 |
| clenbuterol | 260.1 | 169.1 | 35 | paroxetine | 330.2 | 192.0 | 35 |
| clobazam | 301.2 | 259 | 35 | penbutolol | 292.0 | 236.0 | 20 |

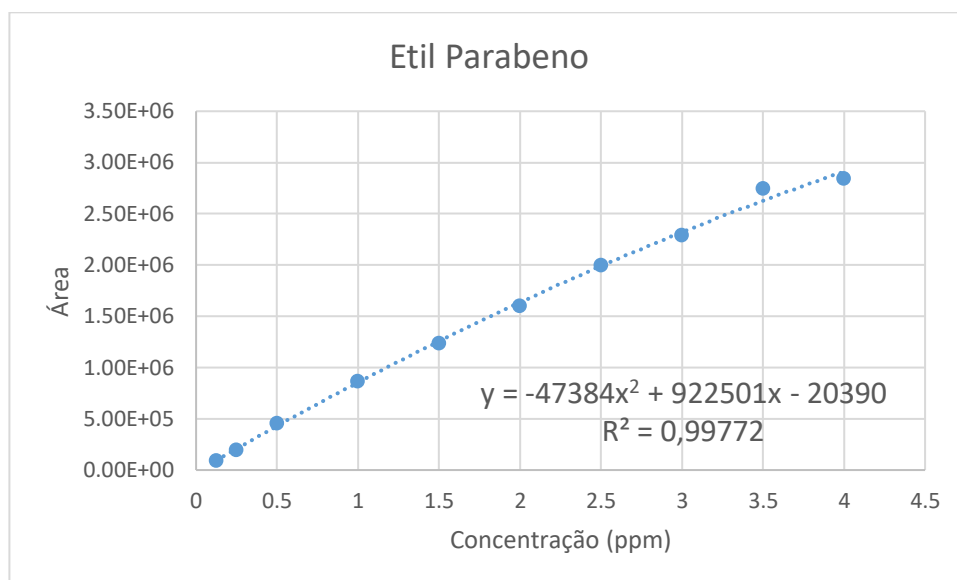
| Name | Q1* | Q3* | CE* | Name | Q1* | Q3* | CE* |
|---------------------------------------|-------|-------|-----|-----------------------|-------|-------|-----|
| clobazam, nor- | 287 | 245 | 35 | pentoxyverine | 334.2 | 100 | 35 |
| clobutinol | 256.2 | 238 | 20 | perazine | 340.2 | 141.1 | 35 |
| clomethiazole | 162 | 113 | 35 | perphenazine | 404.2 | 171.3 | 35 |
| clomipramine | 315 | 86 | 35 | pethidine | 248.2 | 220.3 | 35 |
| clomipramine, desmethyl- | 301.2 | 270.3 | 20 | phenazone | 189.2 | 147 | 35 |
| clonazepam | 316 | 270 | 35 | phenylbutazone | 309.2 | 160.3 | 35 |
| clonidine | 230 | 213 | 35 | phenylpropanolamine | 152.2 | 134.2 | 20 |
| clozapine | 327.1 | 270.1 | 35 | phenyltoloxamine | 256.2 | 72 | 35 |
| cocaine | 304.2 | 182.0 | 35 | phenytoin | 253.2 | 182.3 | 20 |
| codeine | 300.2 | 215.0 | 35 | pilocarpine | 209.2 | 95.1 | 35 |
| coumactetralyl | 293 | 175 | 35 | pindolol | 249.2 | 172.0 | 20 |
| cyclizine | 267.4 | 167.2 | 20 | pioglitazone | 357.0 | 134.2 | 35 |
| D ₂ -doxepin | 283.1 | 107 | 35 | pirbuterol | 241.1 | 167.2 | 20 |
| D ₂ -diazepam | 290.1 | 198.1 | 50 | piroxyca m | 332.0 | 164.0 | 20 |
| D ₂ -THC-COOH ^a | 348 | 196 | 50 | practolol | 267.2 | 225.0 | 20 |
| demoxepam | 287 | 269 | 20 | prajmalium | 369.2 | 158.2 | 50 |
| dextropropoxyphene | 340.0 | 266.0 | 20 | prazepam | 325 | 271 | 35 |
| diazepam | 285.0 | 222.0 | 35 | prazosin | 384 | 247 | 35 |
| dibenzepin | 296 | 251 | 20 | prilocaine | 221.2 | 86 | 20 |
| dihydrocodeine | 302 | 199.0 | 50 | primidone | 219.2 | 162.3 | 20 |
| dihydroergotamine | 584.2 | 270.2 | 35 | procainamide | 236 | 163 | 20 |
| dilazep | 605.2 | 195 | 50 | procaine | 237 | 164 | 20 |
| diltiazem | 415 | 178.0 | 35 | promazine | 285.0 | 86.0 | 20 |
| diphenhydramine | 256.0 | 167.2 | 20 | promethazine | 285.2 | 240 | 20 |
| dipyridamole | 505.2 | 429.3 | 50 | prometryn | 242.2 | 158.2 | 35 |
| disopyramide | 340.2 | 239 | 20 | propafenone | 342.2 | 324 | 20 |
| dixyrazine | 428.2 | 229 | 35 | propionylpromazine | 341.2 | 86.1 | 20 |
| doxapram | 379.2 | 292.3 | 35 | propranolol | 260.2 | 156.0 | 35 |
| doxepin | 280.2 | 235.0 | 20 | propyphenazone | 231.1 | 56.1 | 50 |
| ebastine | 470.2 | 203.0 | 35 | prothipendyl | 285.9 | 241.1 | 20 |
| ecgonine methyl ester | 200 | 81.0 | 35 | protriptyline | 264.2 | 191.2 | 35 |
| embutramide | 294.2 | 208 | 20 | pseudoephedrine | 166.2 | 148.0 | 20 |
| enalapril | 377.1 | 234.2 | 35 | quetiapine | 384.1 | 253.1 | 20 |
| eprosartan | 425 | 207.3 | 35 | quina pril | 439.3 | 234.1 | 20 |
| ergotamine | 582.2 | 564.3 | 20 | quinine | 325.2 | 307.0 | 35 |
| esmolol | 296.2 | 145.2 | 35 | ramipril | 417.1 | 234.3 | 35 |
| ethenzamide | 166.2 | 149 | 20 | ranitidine | 315.2 | 176 | 20 |
| ethylmorphine | 314.2 | 229.0 | 35 | repaglinide | 453.3 | 230.3 | 35 |
| ethylparrathion | 292 | 236 | 20 | reproterol | 390.1 | 372.2 | 20 |
| felodipine | 384.2 | 338.2 | 20 | risperidone | 411.0 | 191.0 | 35 |
| fenazepam | 351.0 | 206.0 | 50 | rocuroonium | 529.4 | 487.2 | 35 |
| fendiline | 316.1 | 212.4 | 20 | ropivacaine | 275.2 | 126.0 | 35 |
| fenetyline | 342.2 | 207 | 35 | rosiglitazone | 358.0 | 135.4 | 35 |
| fenfluramine | 232 | 159 | 35 | scopolamine | 304.2 | 138.2 | 35 |
| fentanyl | 337.2 | 188.3 | 35 | sertindole | 441.2 | 113.0 | 35 |
| fexofenadine | 502.2 | 466.2 | 35 | sertraline | 306.0 | 275.2 | 20 |
| flecainide | 415.2 | 398.3 | 35 | sildenafil | 475.1 | 100.1 | 35 |
| fluconazole | 307.2 | 238 | 20 | sotalol | 273.2 | 255.0 | 20 |
| flunitrazepam | 314.2 | 268.3 | 35 | sulindac | 357.0 | 233.0 | 35 |
| fluoxetine | 310.2 | 148.0 | 20 | sulpride | 342.2 | 214 | 35 |
| flupentixol | 435.2 | 390.3 | 35 | talinalol | 364.2 | 308.3 | 20 |
| fluphenazine | 438.1 | 171.2 | 35 | telmisartan | 515 | 497.1 | 50 |
| flurazepam | 388.0 | 315 | 20 | temazepam | 301.0 | 255.0 | 35 |
| fluvoxamine | 319.2 | 259 | 20 | terfenadine | 472.2 | 436.4 | 35 |
| gallopamil | 485 | 165.0 | 35 | tertalolol | 296.3 | 240.2 | 20 |
| glibendamide | 494.4 | 369.0 | 20 | tetracaine | 265.2 | 176 | 20 |
| glibornuride | 367.1 | 152.2 | 35 | tetrahydrocannabinol | 315.2 | 193.2 | 20 |
| gliclazide | 324.4 | 127.1 | 35 | THC-COOH ^d | 345 | 327.0 | 20 |
| gimepiride | 491.1 | 352.1 | 20 | theobromine | 181.0 | 138.0 | 20 |
| glipizide | 446.2 | 321.0 | 20 | theophylline | 181.2 | 124.2 | 20 |
| gliquidone | 528.0 | 403.4 | 20 | thioridazine | 371.0 | 126.0 | 35 |
| haloperidol | 376.0 | 165.0 | 35 | tilidine | 274.2 | 155.1 | 20 |
| heroin | 370.0 | 165.0 | 50 | timolol | 317.2 | 261.0 | 20 |
| hydrocodone | 300.2 | 199.0 | 35 | tiotixene | 444.2 | 98.1 | 50 |
| hydroxychloroquine | 336.2 | 247 | 35 | tizanidine | 254.0 | 210.0 | 35 |
| hydroxyzine | 375.2 | 201 | 35 | tocainide | 193.5 | 122.2 | 20 |

| Name | Q1* | Q3* | CE* | Name | Q1* | Q3* | CE* |
|----------------------------|-------|-------|-----|-------------------|-------|-------|-----|
| imipramine | 281.2 | 208 | 35 | tolbutamide | 271.1 | 155.0 | 20 |
| indomethacin | 358.0 | 138.8 | 20 | toliprolol | 224.2 | 147.1 | 20 |
| irbesartan | 429.3 | 207.3 | 35 | tolubutanol | 228.1 | 154.1 | 20 |
| isoniazid | 138.2 | 121 | 20 | tramadol | 264.0 | 58.0 | 20 |
| isradipine | 372.4 | 340.0 | 20 | trazodone | 372.0 | 176.0 | 35 |
| ketamine | 238.2 | 220 | 20 | triamterene | 253.8 | 237.0 | 35 |
| ketoprofen | 255.0 | 209.0 | 35 | triazolam | 343.0 | 300.8 | 35 |
| ketorolac | 256.2 | 105.0 | 20 | trifluoroperazine | 408.2 | 141.2 | 35 |
| labetalol | 329.2 | 311.0 | 20 | trifluoperidol | 410.1 | 165.2 | 20 |
| lacidipine | 354.0 | 310.1 | 35 | trimethoprim | 291.2 | 230.0 | 35 |
| lamotrigine | 256.0 | 211.0 | 35 | trimipramine | 295.2 | 100.0 | 20 |
| lercarnidipine | 612.1 | 280.1 | 35 | valsartan | 436.0 | 306.0 | 20 |
| levobunolol | 292.0 | 236.0 | 20 | varidenafil | 489 | 151.1 | 50 |
| levocabastine | 421.2 | 375.0 | 35 | venlafaxine | 278.2 | 260.3 | 20 |
| levomepromazine | 329.0 | 242.0 | 35 | verapamil | 455.2 | 165.0 | 35 |
| lidocaine | 235.2 | 86.0 | 20 | warfarine | 309.2 | 251.0 | 20 |
| lisinopril | 406.2 | 246.1 | 35 | zolpidem | 308.2 | 235.3 | 35 |
| loratadine | 383.0 | 337.0 | 35 | zopiclone | 389.0 | 245.0 | 20 |
| lorazepam | 321.2 | 303.0 | 20 | zuclopenthixol | 401.1 | 231.0 | 35 |
| losartan | 423 | 405.3 | 20 | vincamine | 355.1 | 337.2 | 35 |
| lysergic acid diethylamide | 324.2 | 223.0 | 35 | zimeldine | 318.9 | 274 | 20 |

Fonte: MULLER, C. A. et al. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a Strap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library teaching. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**. Freiburg, p. 1332-1338. mar. 2005.

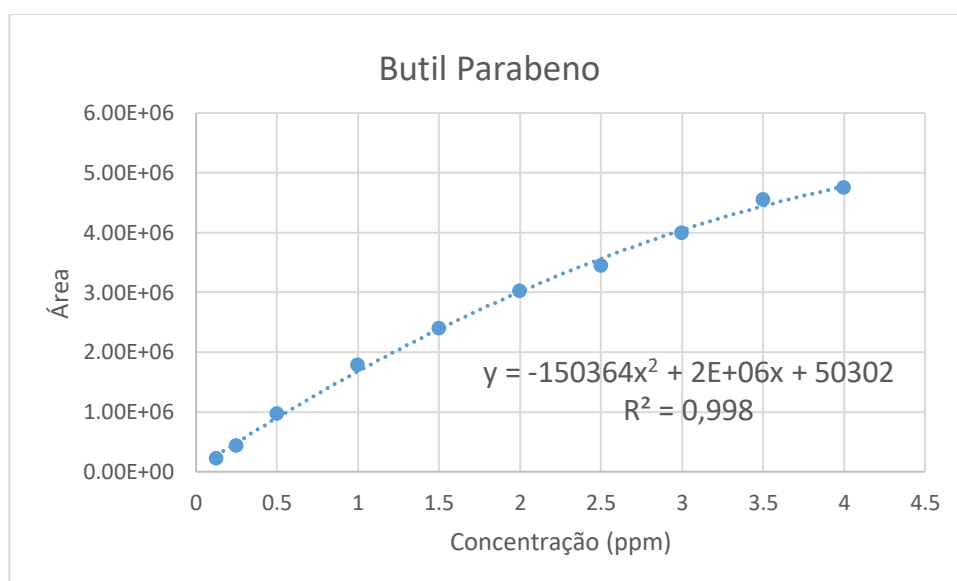
Apêndices

Apêndice 1. Curva de calibração do etil parabeno por detecção por espectrometria de massas.



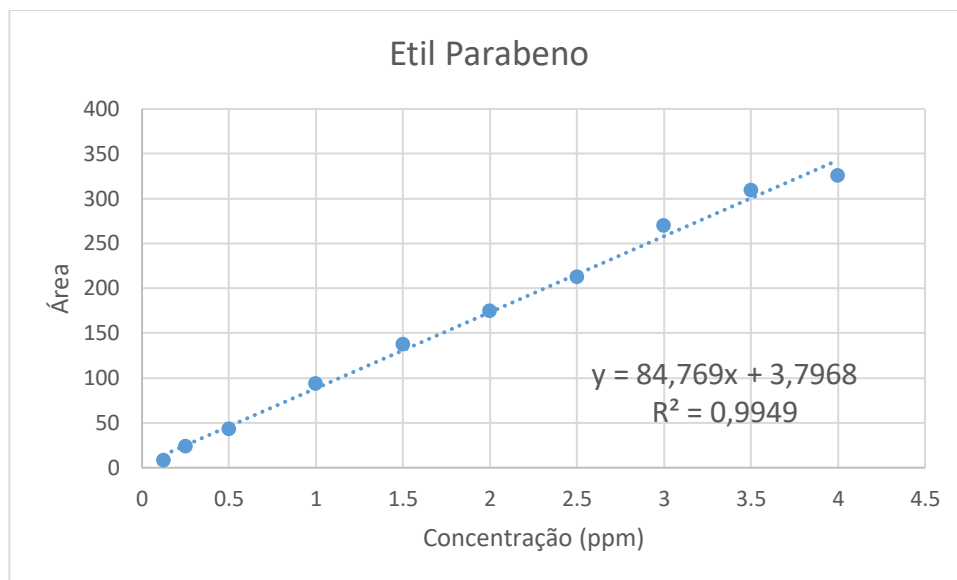
Fonte: Autora

Apêndice 2. Curva de calibração do butil parabeno por detecção por espectrometria de massas.



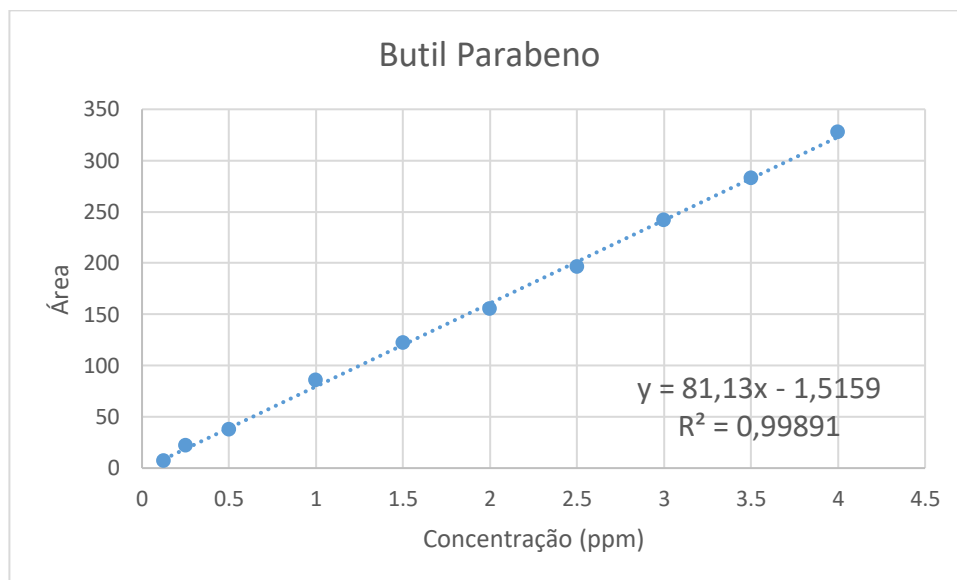
Fonte: Da autora

Apêndice 3. Curva de calibração do etil parabeno por detecção por arranjo de diodos



Fonte: Da autora

Apêndice 4. Curva de calibração do butil parabeno por detecção por arranjo de diodos



Fonte: Da autora